

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

Murat HAMZAOĞLU

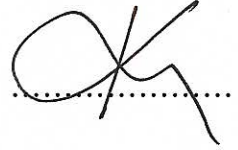
**Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**ZONGULDAK
Haziran 2012**

KABUL:

Murat HAMZAOĞLU tarafından hazırlanan “DİRİTROMİSİNİN *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)’NİN BAZI BİYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNE 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. Hale SÜTÇÜ (BEÜ)



Üye : Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL (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.”



Murat HAMZAOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

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

Murat HAMZAOĞLU

Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Haziran 2012, 61 sayfa

Büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* L. yapay besin ortamında beslenerek makrolid grubu bir antibiyotik olan diritromisinin böceğin yaşama, gelişme, eşey oranı, ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu, yumurta verimi, açılma oranı gibi biyolojik özellikleri üzerine etkisi laboratuvar şartlarında incelendi. Ayrıca bu antibiyotiğin böceğin son evre larvalarının orta bağırsağında oksidatif stresin önemli indikatörleri lipid peroksidasyonu ürünü malondialdehid (MDA) ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil miktarları ile detoksifikasyon enzimi glutatyon S-transferaz (GST), aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Böceğin birinci evre larvaları % 0,001, 0,01, 0,1 ve 1,0 oranında diritromisin içeren yapay besinler ile ergin evreye kadar beslendi. Kontrol besine göre diritromisinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler böceğin gelişme evrelerindeki (7. larval evre, pup ve ergin) yaşama oranını önemli derecede

ÖZET (devam ediyor)

düşürmüştür. Diritromisinin en yüksek konsantrasyonu (%1,0) ergin olma oranını $81,9 \pm 4,11$ 'den $15,2 \pm 3,63$ 'e düşürmüştür. Bu konsantrasyonu içeren besinden $5,5 \pm 0,00$ erkek, $9,7 \pm 3,60$ dişi elde edilmiştir. Diritromisinin en yüksek konsantrasyonu böceğin gelişme süresini de önemli derecede uzatmıştır. Bu besinle beslenen larvalar kontrol grubuna göre ortalama 4 gün daha geç pup evresine ulaşırken ergin evrede bu gecikme 2 gün olarak belirlenmiştir. Diritromisin erkek ve dişi erginlerin ömür uzunluğu üzerinde önemli derecede etkili olmamıştır. Diritromisinin denenen tüm konsantrasyonları kontrole göre, yumurta verimini önemli derecede düşürmüştür. Diritromisinin denenen en yüksek konsantrasyonu yumurta sayısını $83,4 \pm 0,89$ 'den $32,6 \pm 2,82$ 'ya açılma oranını ise $72,5 \pm 4,82$ 'den $33,7 \pm 9,97$ 'ye düşürmüştür.

Diritromisinin denenen tüm konsantrasyonları 7. evre larvalarının orta bağırsak MDA ve protein karbonil miktarlarını önemli derecede artırmıştır. Diritromisinin en yüksek miktarını (% 1,0) içeren besin MDA miktarını $0,054 \pm 0,002$ 'den $0,19 \pm 0,02$ nmol/mg proteine yaklaşık 3,5 katı oranında, protein karbonil miktarını $113,53 \pm 4,4$ 'den $640,84 \pm 48,2$ nmol/mg proteine yaklaşık 6 katı oranında önemli derecede artırmıştır. Buna karşılık, yalnızca % 0,1 ve 1,0'lik diritromisin konsantrasyonları GST aktivitesinde önemli bir artışa (7 katı oranında) sebep olmuştur. Bu besinler GST aktivitesini $2,24 \pm 0,8$ 'den sırasıyla $16,01 \pm 3,0$ ve $16,68 \pm 4,0$ $\mu\text{mol/mg protein/dk}$ 'ya kadar artırmışlardır

Bu çalışma böceğin biyolojik özellikleri ile orta bağırsak oksidatif durum ve detoksifikasyon kapasitesinde diritromisin konsantrasyonlarına bağımlı değişimler olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar aynı zamanda bu biyolojik ve oksidatif etkilerin diritromisinin denenen konsantrasyonları tarafından meydana getirilen oksidatif stresin düzeyine göre değişebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*, diritromisin, yaşama oranı, Malondialdehid, protein karbonil, Glutatyon S-transferaz, beslenme

Bilim Kodu: 401.02.01

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

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

Murat HAMZAOĞLU

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

Thesis Advisor: Prof. Kemal BÜYÜKGÜZEL

June 2012, 61 pages

The effect of a macrolid antibiotic dirithromycin on survivorship, development, sex ratio, male and female adult longevity, fecundity and hatchability of greater wax moth *Galleria mellonella* L. were investigated by rearing the first instar larvae on artificial diets in the laboratory condition. 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 (last larval stage) of the insect were also investigated. The insect was reared from first-instar larvae on an artificial diets containing dirithromycin at 0.001, 0.01, 0.1 or 1.0% to adult stage. Relative to the control, the diets containing dirithromycin concentrations significantly resulted in decreased survivorship

ABSTRACT (continued)

in development stages (7th-instars, pupae and adults) of the insect. The highest concentration of dirithromycin (1.0%) significantly decreased adult yield from 81.9 ± 4.11 to $15.2 \pm 3.63\%$. This concentration produced 5.5% male, $9.7 \pm 3.60\%$ female. The highest dirithromycin concentration also significantly prolonged developmental time of the insect. This concentration significantly delayed pupal development by 4 days, and adult development by 2 days in comparison to control. Dirithromycin had no significant effect on male and female adult longevity. Dirithromycin at all concentrations resulted in significantly decreased fecundity. The highest concentration of this antibiotics lowered egg number from 83.4 ± 0.89 to 32.6 ± 2.82 , hatchability from 72.5 ± 4.82 to $33.7 \pm 9.97\%$.

Dirithromycin significantly increased MDA and PCO contents in midgut of 7th-larval instar. This macrolid antibiotic at highest dietary concentration significantly increased MDA content from 0.054 ± 0.002 to 0.19 ± 0.02 nmol/mg protein (3.5-fold), PCO content from 113.53 ± 4.4 to 640.84 ± 48.2 nmol/mg protein (6-fold) in comparison to control. However, only 0.1 and 1.0% dirithromycin significantly resulted in increased GST activity (7-fold). These concentrations increased GST activity from 2.24 ± 0.8 to 16.01 ± 3.0 and 16.68 ± 4.0 $\mu\text{mol/mg protein/min}$ respectively.

This study showed a concentration-dependent variation in biological traits of the insect, and oxidative status and detoxification capacity of midgut. The results also showed these biological and oxidative effects might be altered in response to the perceived levels of dirithromycin-induced oxidative stress. We concluded that the lethal and sublethal effects of dirithromycin are likely to have a significant impact on oxidative and antioxidative status of midgut as well as biological traits of pest insects.

Keywords: *Galleria mellonella*, dirithromycin, survivorship, Malondialdehyde, protein carbonyl, Glutathione S-transferase, nutrition

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 aŐamasında değerli öneri ve bilgilerinden yararlandığım Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL'e (BEÜ), teŐekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalıŐmalarımnda ve tez yazımında bana yardımcı olan Öğr. Gör. Meltem ERDEM'e (BEÜ) teşekkür ederim. Diritromisini bu çalışma için hediye eden Abdi İbrahim İlaç Firması'na, çalıŐmamın deneysel ve yazma aŐamasında moral desteği ve yardımlarını esirgemeyen aileme ve yüksek lisans arkadaşlarıma teŐekkürlerimi sunarım. Bu alıŐma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü 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	13
2.1 <i>GALLERIA MELLONELLA</i> L. KÜLTÜRÜNÜN DEVAMI	13
2.2 DİRİTROMİSİNİN DENEYLERDE KULLANILMASI.....	14
2.3 LARVALARIN ELDE EDİLMESİ.....	14
2.4 YAŞAMA, GELİŞME, EŞEY ORANI VE ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞU İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ.....	15
2.5 DIŞİLERİN YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI İLE İLGİLİ DENEYLER.....	16
2.6 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ	17
2.6.1 Orta Bağırsak İzolasyonu	17
2.6.2 Malondialdehid (MDA).....	17
2.6.3 Protein Karbonil.....	18
2.6.4 Glutasyon S-transferaz (GST).....	19
2.7 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	20

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3 ARAŞTIRMA BULGULARI	21
3.1 DİRİTROMİSİNİN <i>G. MELLONELLA</i> LARVALARININ YAŞAMA, GELİŞME VE EŞEY ORANINA ETKİSİ	21
3.2 DİRİTROMİSİNİN <i>G. MELLONELLA</i> 'NİN ÖMÜR UZUNLUĞU, YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ETKİSİ	23
3.3 DİRİTROMİSİNİN <i>G. MELLONELLA</i> ORTA BAĞIRSAĞINDA MDA, PROTEİN KARBONİL VE GST AKTİVİTESİNE ETKİSİ	25
BÖLÜM 4 TARTIŞMA	29
BÖLÜM 5 SONUÇ	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Diritromisinin kimyasal yapısı	5
1.2 Lipid peroksidasyonu ürünü MDA'nın oluşumu.	7
3.1 Diritromisinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta bağırsak MDA miktarına etkisi.	26
3.2 Diritromisinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta bağırsak protein karbonil miktarına etkisi.	26
3.3 Diritromisinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta bağırsak GST aktivitesine etkisi.....	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
3.1	Diritromisinin <i>G. mellonella</i> larvalarının yaşama, gelişme ve eşey oranına etkisi	22
3.2	Diritromisinin <i>G. mellonella</i> larvalarının ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranına etkisi.....	24

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

⁰ C	: Santigrad derece
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
kg	: Kilogram
lt	: Litre
M	: Molar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
nmol/mg protein	: Nanomol/miligram protein
sn	: Saniye
µl	: Mikrolitre
µmol/mg protein/dk	: Mikromol/miligram protein/dakika

KISALTMALAR

4-HNE	: 4-hidroksi-2 nonenal
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	: Ditiyotreititol

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO·	: Hidroksil radikali
JH	: Jüvenil hormon
LSD	: Least Significant Difference
MDA	: Malondialdehid
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
PCO	: Protein karbonil
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
ROO·	: Peroksit radikali
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklorasetik asit
TPx	: Tiyoredoksin peroksidaz
TrxR	: Tiyoredoksin redüktaz
UV	: Ultraviole
χ^2	: Ki kare (Chi square)

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tarımsal zarara sebep olan en önemli canlı grubu böceklerdir. Lepidoptera takımına ait türler bu grup içerisinde önemli bir yer tutmaktadır. Böcekler tarımsal ürünlerin çeşitlilik, kalite, verim, depolama, pazarlama kalitesini düşürürken aynı zamanda çeşitli hastalıkların taşınmasında aracı olduklarından insan ve hayvan sağlığı açısından da tehdit oluşturmaktadır. Büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* L. larvaları kovanlarda bal peteği, mum ve bal ile beslenerek arıcılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Charriere and Imdorf 1997). Fizyolojik araştırmalarda kullanılmak üzere mikrobiyal floradan arındırılmış böcek elde etmek amacıyla, bu böceğin larvaları laboratuvar şartlarında çeşitli antibakteriyel ve antifungal antibiyotikleri içeren yapay besinler ile yetiştirilmeye çalışılmıştır (Jarosz 1979, 1981, 1989). Bu çalışmalar denenen antibiyotiklerin larvaların yaşama oranı ve gelişme süresini olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Antiviral antibiyotik olan asiklovirin ilave edildiği besinler ile beslenen *G. mellonella* larvalarının yaşama oranı azalmış, gelişme süresi uzamış ve yaş ağırlığı azalmıştır (İçen 2003). Ancak antibiyotiklerin böceğin yaşama oranı, gelişme süresi ve diğer biyolojik özelliklerini etkileyecek düzeyde orta bağırsakta oksidatif strese sebep olduğu ve bu strese karşı antioksidatif tepki mekanizmasını uyardığı konusunda yapılan çalışmalar sınırlıdır (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009). Yapılan çalışmalarda daha çok bazı çevresel kirleticilerin *G. mellonella* ve Lepidoptera takımına ait diğer bazı böceklerin hemolenfinde oksidatif stres ve bu strese karşı antioksidatif savunma mekanizması üzerine etkisi incelenmiştir (Slepneva et al. 1999, Glupov et al. 2001, 2003, Lozinskaya et al. 2004, Aucoin et al. 2005). Ancak, bu böceğin orta bağırsağında ksenobiyotiklere karşı oluşturulacak dokuya özgü bir antioksidatif cevap hakkındaki bilgiler oldukça yetersizdir (Dubovskiy et al. 2005, 2008).

Böceklerde sindirim enzimlerinin salgılandığı, besinlerin sindirilerek emilime uğradığı orta bağırsak, sindirim kanalının önemli bir bölümüdür (Sehnal and Zitnan 1996). Lepidoptera takımına ait bazı türlerin larvalarında allelokimyasalların sindirimi ile oluşturulan reaktif

oksijen türlerinin orta bağırsak hücrelerinde oksidatif hasara sebep olduğu ve enzimatik antioksidan savunma sistemini zayıflattığı tespit edilmiştir (Peric-Mataruga et al. 1997, Krishnan and Sehnal 2006, Krishnan et al. 2007). Lepidoptera takımına ait böceklerin orta bağırsağının alkali ve geniş bir indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip olması antibiyotiklerin sindirimi sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu kolaylaştırabilir (Terra et al. 1996). Böceklerin yağ dokusu ve diğer bazı dokularında antibiyotiklerin oksijenaz enzimleri ile oksidasyonu sırasında da yan ürün olarak ROT'lar oluşabilir (Graf and Benz 1970).

Böceklerin orta bağırsak, hemolenf ve yağ dokusunda bazı sekonder metabolitlerin sebep olduğu oksidatif strese karşı enzimatik antioksidatif savunma sisteminin önemi detaylı olarak incelenmiştir (Pritsos et al. 1991, Ahmad et al. 199, Barbehenn and Stannard 2004, Felton and Summers 1995, Bi and Felton 1995, Timmermann et al. 1999, Krishnan and Kodrik 2006). Böceklerde orta bağırsak oksidatif durumu ve enzimatik antioksidatif savunma sistemi üzerinde yapılan çalışmalar daha çok fenolik maddeler (taninler, fenolik asit, flavonlar, lignin, gliseollin), kinonlar ve furanokoumarinler (ksantotoksin, izopimpinellin, angelisin) ile ilgilidir (Lee and Berenbaum 1990, Barbehenn et al. 2005, Brown et al. 2005, Barbehenn et al. 2008, Barbehenn et al. 2006, Chen 2008). Bu sekonder metabolitlerin yüksek konsantrasyonlarda böceklerin yaşama, gelişme, vücut büyüklüğü üzerinde olumsuz etkiler yaptığı gözlenmiştir. Lepidoptera takımına ait bazı böcekler orta bağırsakta allelokimyasal toksisitesine karşı özel sitokrom P-450 monooksijenaz enzimleri ile savunma gösterirler (Ivie et al. 1983). Böcek orta bağırsağında antibiyotiklerin sebep olduğu oksidatif strese ve bu stres ile ilişkili biyomoleküler hasara karşı enzimatik antioksidatif savunma sisteminin önemi üzerinde sınırlı çalışma bulunmaktadır. Antibiyotiklerin sindirimi sırasında orta bağırsak karşılaşılan ilk engel olduğundan *G. mellonella* ile yapılan bu çalışmada besinle alınan dinitromisin'in sebep olduğu biyomoleküler hasara karşı bir savunma mekanizması olarak orta bağırsak detoksifikasyon enzimi GST'nin önemi belirlenecektir.

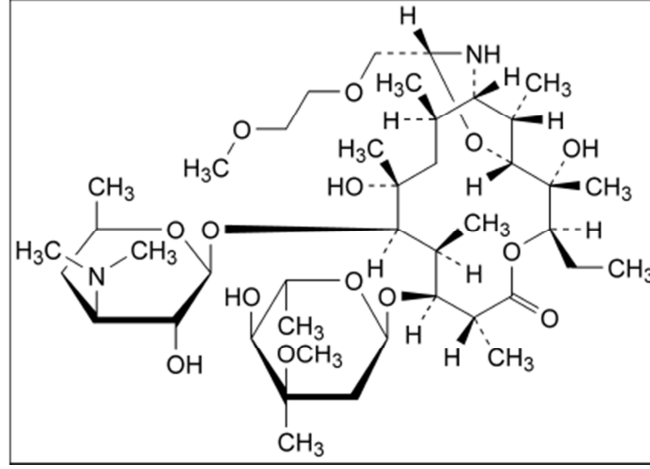
Antibiyotikler mikrobiyal kontaminasyonları önlemek, böcekler üzerindeki etkisiz miktarlarını tespit etmek, büyümeyi hızlandırmak ve beslenmeyi uyarmak amacıyla böcekleri beslemek için kullanılan yapay besinlere ilave edilmektedir (Liles 1958, Ouye 1962, Vail et al. 1968, Singh and House 1970 Xie et al. 1986, Grenier and Liu 1990, Pearson and Raybould 1998, Büyükgüzel 2001, Büyükgüzel ve Yazgan 2002, Alverson and Cohen 2002, Inglis and Cohen 2004). Bu antibiyotiklerin düşük konsantrasyonları gelişimi hızlandırmış, yaşama

oranını, ergin ömür uzunluğunu ve vücut ağırlığını artırırken, yüksek konsantrasyonlarda ise böcekler üzerinde olumsuz etkiler yapmıştır (Chamberlain and Schol 1991, Hirose et al. 2006). Böceğin yaşama oranı ve gelişme süresi üzerine etkisiz olan konsantrasyonların üzerindeki konsantrasyonlarda penisilin G, streptomisin sülfat, ve geleneksel olarak kullanılan antifungallerinde dahil olduğu birçok antimikrobiyal madde *Agria affinis* (Fallen)'ın gelişimini geciktirmiş, larval ve pupal evrelerinde ölüm oranını arttırmıştır (Singh and House 1970). Besine farklı konsantrasyonlarda ilave edilen antibakteriyel antibiyotik novobiyosin Hymenoptera takımına ait endoparazitoid bir tür olan *Pimpla turionellae*'nin yaşama oranını düşürmüş gelişme süresini ise uzatmıştır (Büyükgüzel 2001). Diğertaraftan yaygın kullanıma sahip bazı antifungal maddelerin *Lygus hesperus* (Knight)'ın yaşaması, gelişimi, üremesi ve erginlerin kuru ağırlığı üzerine önemli derecede olumsuz etkiler yaptığı gösterilmiştir (Alverson and Cohen 2002). *Bemisia tabaci* (Gennadius) erginlerinin rifampisin ile muamale edilmesi gelişimi önemli derecede geciktirmiş ve yaşamayı düşürmüştür (Ruan et al. 2006). Antibiyotikler böceklerin biyolojisi üzerinde olumsuz etkiler göstermelerine rağmen böceklerdeki etki mekanizmaları tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Bazı antiviral antibiyotiklerin böcek hücreleri üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğunun gösterilmesi dikkatleri antibiyotiklerin böceklerdeki etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik çalışmalara yöneltmiştir (Sula et al. 1987).

Antibiyotiklerin böceğin biyolojik parametreleri üzerindeki bu etkilerinin yanında Lepidoptera takımına ait böceklerin toplam vücut ağırlığı ve protein miktarındaki değişimler de antibiyotiklere karşı oluşturulan önemli fizyolojik adaptasyon mekanizmalarıdır (Eid et al. 1989, Büyükgüzel and Kalender 2008). Çeşitli organofosforlu insektisitler içeren besinler ile beslenen *G. mellonella* larvaları da benzer adaptasyon mekanizmaları göstermiştir (İçen et al. 2005). İnsektisitlere dirençli böceklerin yağ doku hücrelerinde önemli derecede protein depolandığının tespit edilmesi ve bu böceklerin daha fazla vücut ağırlığına sahip olması, toksik maddelere maruz kalan bir organizmanın yaşamının devamını sağlamak için yeterli miktarda enerji depoladığını göstermiştir (Guedes et al. 2006). Yeterli miktarda enerji kaynağı bulunmadığı durumda böceğin gelişimi, yaşamı ve üremesi olumsuz yönde etkilenmektedir (Harak et al. 1999). İnsektisitler böceklerde besin maddelerinin depolandığı dokuların hücre hacmini, karbohidrat ve protein miktarını ve bunların metabolizmalarını etkilemektedir (Orr and Downer 1982, Nath et al. 1997). Larval evrede besinle alınarak depolanan proteinler ergin gelişimi sırasında önemli role sahiptir (Hahn and Wheeler 2003). Yapay besinlere ilave edilen antibiyotiklerin farklı böcek gruplarında protein sentezi ve diğer

bazı metabolik olayları etkilediği bilinmektedir (Mittler 1971, Griffiths and Beck 1974, Keeley and Olson 1977, Holmes and Keeley 1975, Byars and Wood 1981). Bir böceğin yaş ağırlığı, tüm vücuttaki ya da belirli bir dokudaki toplam protein miktarındaki değişimler besinsel antibiyotiklerin toksisitesinin değerlendirilmesinde önemli biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır (Thayer 1973, Büyükgüzel 2002, Büyükgüzel and İcen 2004). Ayrıca, böceklerde antibiyotik toksisitesinin şiddetini ortaya koyan belirteçler olarak transaminazlar ALT ve AST enzimlerinin aktivitelerindeki değişimlerin de önemli olduğu belirtilmiştir (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2009). Bazı antibiyotikleri içeren doğal besinler ile beslenen *Philosamia ricini* (Boisd.) larvalarında normal metabolizmanın işleyişinin bozulmasının bir göstergesi olarak bu transaminaz enzimlerinin aktifliğinde artış gözlenmiştir (Eid et al. 1989). Transaminaz enzimleri lepidoptera takımına ait böceklerin orta bağırsağında meydana gelen trikarboksilik asit devrine aminoasit metabolizması aracılığıyla substrat sağlamaktadır (Parenti et al. 1985).

Diritromisin insanlarda solunum sistemi enfeksiyonlarında kullanılan 14 üyeli (lakton halkası) yeni nesil bir makrolid antibiyotiktir (McConnell et al. 1999, Muler and Wettich 1993, Aydın 2007) (Şekil 1.1). Diritromisin bakterilerde 50S ribozom alt birimine bağlanarak aynı yere t-RNA molekülünün bağlanmasını ve böylece protein sentezini inhibe eder (Aydın 2007). Eritromisinin yarı sentetik bir türevi olup etki mekanizması açısından eritromisin, roksitromisin ve azitromisine benzer (Wintermeyer et al. 1996). Diritromisin oral yolla alındıktan sonra hızla emilir, nonenzimatik yolla hidroliz olarak emilim sırasında mikrobiyolojik aktif olan eritromisilamine dönüşür. Eritromisilamin proteinlere %15-30 oranında bağlanır ve vücutta çok geniş bir alana yayılır. Diritromisin omurgalılarda (eritromisilamin) karaciğerde düşük oranda metabolize edilir (Brogden and Peters 1994). Diritromisin klaritromisin ve eritromisin gibi diğer makrolid antibiyotiklerden farklı olarak karaciğer sitokrom P-450 (CYP) enzim sistemleri tarafından metabolize edilmemektedir. Alınan dozun büyük çoğunluğu fekal (dışkı) yolla, çok az bir kısmı ise idrarla elimine edilmektedir. Diritromisinin eliminasyon yarı ömrü 30-44 saattir. Makrolidlerin doku konsantrasyonları plazmadan daha yüksektir ve doku seviyeleri uzun süre yüksek devam eder (Kirst et al. 1995).



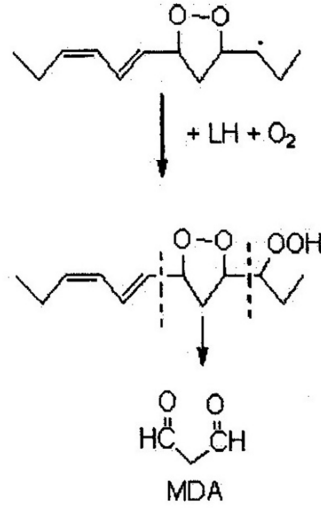
Şekil 1.1 Diritromisinin kimyasal yapısı

Diritromisinin tarımsal zararlı böceklerin mücadelesinde kullanımı ve depolanmış ürün zararlılarına etkileri hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma insan sağlığı açısından önemli antibiyotiklerin çevreye ve hedef olmayan diğer canlılara karşı güvenli bir şekilde zararlı böceklerin mücadelesinde insektisit olarak kullanılmasını araştırması açısından önemlidir. Bu çalışma ayrıca antibiyotikler tarafından uyarılan oksidatif stresin böceğin biyolojik etkinliğini olumsuz yönde etkileyen önemli bir faktör olup olmadığını gösterecektir. Bu durumda çözüm bekleyen en önemli sorulardan biri, antibakteriyel antibiyotiklerin böceklerin yaşama oranını ve gelişme süresini hangi mekanizma ile etkiledikleridir. Bu çalışmada, diritromisin'in asıl etki mekanizmasının yanında ikincil bir etki mekanizması olarak oluşturduğu oksidatif stres aracılığıyla böceklerin yaşam parametrelerini ve diğer biyokimyasal işlevlerini etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla böceklerdeki antibiyotik toksisitesi hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Antibiyotikler prokaryotik mikroorganizmalardaki asıl etki mekanizmalarının yanı sıra, omurgalılarda reaktif oksijen türleri oluşturarak lipid peroksidasyonuna ve antioksidan enzim aktivitesinin değişimine sebep olduğu bilinmektedir (Miyachi et al. 1986, Vijayalekshmy et al. 1992, Abdrashitosa and Ramanov 2001). Ancak antibiyotiklerin oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan lipid peroksidasyonu düzeyini artırdığı bilinmesine rağmen böceklerde protein oksidasyonuna sebep olduğuna yönelik bilgi bulunmamaktadır.

Herbivor böceklerin dahil olduğu tüm aerobik organizmalar yaşamları süresince, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) veya hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretiminden kaynaklanan oksidatif strese maruz kalmaktadır (Ahmad

and Pardini 1990a). Metabolizmaları sırasında kendi kendilerince oksitlenebilen moleküller ve oksidoredüktazlar gibi endojen ROT kaynakları, çekirdek, mitokondri ve mikrozm gibi hücre içi organeller içerisinde yer almaktadır (Barbehenn et al. 2003). Böcekler kimyasal açıdan uygun olmayan bir ortamda yaşamlarını sürdürebilmeleri için metabolizmaları sırasında ROT'ların oluşumuna sebep olan toksik ya da zararlı kimyasal maddeleri oksitleyebilme yeteneğine sahiptir. Reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonuna, protein ve enzim oksidasyonuna ve hücrel glutatyon miktarının eksilmesine sebep olarak böcek dokularında oksidatif hasar oluşturur (Ahmad 1995). Hücrel lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin oksidatif hasar görmesi oksidatif stresin önemli bir göstergesidir. Oksidatif olarak yapısı bozulan lipid molekülleri bir seri zincir reaksiyonu ile son ürün olarak malondialdehid (MDA) oluşturur (Cheesman 1993). Lipid peroksidasyonu ürünü ve önemli bir aldehid türevi olan MDA proteinlerin amino grubu, fosfolipidler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek bu moleküllerin yapısının bozulmasına ve sonuçta oksidatif hasara sebep olur.

Hücre membranlarında lipid peroksidasyonunun ilerleme tepkimeleri ile alkanlar, isoprostanlar ve karbonil bileşikleri (MDA) gibi çok çeşitli yan ürünler açığa çıkmaktadır (Ansari et al. 1989, Djordjevic 2004). Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. İki veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin (Linoleik, linolenik ve araşidonik asitler) peroksidasyonunda tiyobarbitürik asit ile ölçülebilen MDA'in yanında 4-hidroksi-2 nonenal (4-HNE) meydana gelir (Spiteller 2001, Bokov et al. 2004). MDA yağ asidi oksidasyonunun kantitatif bir indikatörüdür ve lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi uyum gösterir. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olan bir aldehid (Şekil 1.2) olup oksidatif stresin derecesi ile orantılı olarak miktarı artmaktadır (Suwalsky et al. 2001).



Şekil 1.2 Lipid peroksidasyonu ürünü MDA'nın oluşumu.

Böceklerde de MDA miktarının yükselmesi lipid peroksidasyonu seviyesinin önemli bir göstergesidir (Ahmad et al. 1995, Mano et al. 1995, Krishnan et al. 2009). Fitofaj böcekler için, lipidler sadece hücre membranı bileşeni değil, ayrıca juvenil hormonlar ve feromonlar gibi diğer fizyolojik fonksiyonlarda rol aldığı için, lipid peroksidasyonu özellikle zararlıdır (Downer 1985).

Oksidatif strese bağlı olarak oluşan *in vivo* DNA ve protein hasarının, lipidlerdeki hasardan daha önemli olduğu bilinmektedir (Reznick and Packer 1994). Proteinlerde *in vivo* olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir.

Oksidatif protein hasarı, protein karbonil (PCO) düzeylerindeki artış (Evans et al. 1999, Levine et al. 1994, Hu 1994) ve protein tiol düzeylerindeki azalma (Takenaka et al. 1991, Bourdon et al. 1999) ile karakterizedir. Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda PCO ürünleri meydana gelir (Evans et al. 1999, Levine et al. 1994, Hu 1994). PCO düzeylerinin saptanmasının oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Evans et al. 1999, Levine et al. 1994, Hu 1994). Diğer taraftan serbest radikaller proteinlerdeki tiol gruplarının

oksidasyonuna yol açarak oksidatif protein hasarına neden olur (Takenaka et al. 1991, Bourdon et al. 1999). Serbest radikallerin oksidan etkisi sonucu meydana gelen oksidatif protein modifikasyonu ve bunun sonucu oksitlenmiş proteinlerin fazla miktarda birikmesi hücre ve doku hasarına neden olur (Stadtman 1992, Dean et al. 1997).

Proteinler serbest radikal saldırılarına doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlıdır. Çok yoğun bir saldırı olmadıkça fazla hasar görmezler (Chesemann and Slater 1993). Protein, geçiş metal iyonunu özel bir bölgeden bağlarsa, geçiş metal iyonu H_2O_2 ile reaksiyona girerek $OH\cdot$ radikalini oluşturur. $OH\cdot$ radikali de hasar verici etkisini metal bağlanma bölgesinde veya ona yakın bölgelerde meydana getirir. Proteinlere olan serbest radikal ataklar, peroksitlerin ve karbonillerin oluşumu ile sonuçlanır.

Böceklerin orta bağırsağında oksidatif hasardan kaynaklanan oksidatif stresin önemli nedeni süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) radikallerinin oluşumudur (Perić-Mataruga et al. 1997, Krishnan and Kodrik 2006). Diğer ökaryotik organizmalar gibi böcekler de oksidatif radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidan enzim sistemine sahiptir (Ahmad 1992). Ayrıca böceklerin orta bağırsağı düşük moleküler ağırlığa sahip antioksidanlar, peritrofik zar ve çeşitli antioksidan enzimlerden oluşan dokuya özgü bir antioksidatif savunma mekanizmasına sahiptir (Ahmad 1992, Felton and Summers 1995, Barbehenn and Stannard 2004). Böceklerde başlıca bulunan antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST) dir (Ahmad et al. 1990). Bunların yanında, *Helicoverpa zea* (Boddie) türünün larva evresinde antioksidan enzim askorbat peroksidazın (APOX) (Mathews et al. 1997) ve *Drosophila*'da ise tiyoredoksin peroksidazın (Missirlis et al. 2003) varlığı tespit edilmiştir. Enzimatik olmayan savunma sistemlerinin başlıca elemanları glutatyon, vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (askorbik asit), melatonin, karoten ve diğer maddelerdir (Hermes-Lima et al. 1998). Antioksidan enzimler arasında ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumlu olan GST enzimi geniş bir substrat spesifikliği gösterir (Vontas et al. 2001). Lepidoptera takımına ait türlerde selenyuma bağımlı GPx enziminin aktivitesi oldukça düşüktür. Bu enzim hidrojen peroksit ve zararlı lipid peroksitleri, substrat olarak indirgenmiş glutatyonu kullanarak metabolize eder (Ahmad et al. 1989). SOD, CAT ve GPx enzimleri, reaktif oksijen türlerine karşı birlikte iş gören bir antioksidan savunma grubunu oluşturur. SOD, süperoksit radikallerinin H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen bir enzim olup besinsel kaynaklı prooksidanlara karşı ilk antioksidan tepkiyi oluşturan enzimlerden biridir (Ahmad and Pardini 1990). CAT enzimi,

H₂O₂'i su ve oksijene indirgemekte olup, APOX enzimi de normal şartlarda CAT tarafından uzaklaştırılmayacak (süpürülemeyecek) kadar düşük konsantrasyonlardaki H₂O₂'i indirgemektedir (Ahmad et al. 1991, Clavaron-Mathews et al. 1997). Lepidoptera takımına ait türlerin besinsel toksik maddelere karşı gösterdikleri fizyolojik bir adaptasyon olarak orta bağırsak dokusunda GST ve GST enziminin GPx benzeri aktivitesinde yükselme olduğu gözlenmiştir (Perić-Mataruga et al. 1997).

GST ksenobiyotiklerin biotransformasyonunda rol oynayan faz II enzim sisteminin önemli bir enzimidir (Sivori et al. 1997, Sheenhan et al. 2000). Başta araşidonik asit ve linolenik asitin (C18: $\Delta^{9,12,15}$) peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksidler olmak üzere lipid peroksidlerine karşı selenyumdan bağımsız GPx aktivitesi (GSTpx) göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluşturur. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak ilaç, herbisit ve insektisit gibi yabancı maddeleri glutatyon (GSH; γ -glutamil-sistenil-glisin)'daki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar (O'Brien and Tew 1996). Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar.

GST'nin böceklerin insektisitlere karşı direnç geliştirmelerinde önemli bir rolü vardır (Syvanen et al. 1996, Wei et al. 2001, Hamimy et al. 2004). GST'ler böceklerde insektisitlerden korunmada rol alan detoksifikasyon enzimlerinin büyük bir ailesidir (Yu 2004). Yüksek GST aktivitesi, insektisitlerin şiddetli toksitesinin izlendiği çoğu böcekte saptanmıştır (Punzo 1993, Vontas et al. 2001). GST ve GSH, reaktif türlerin konjugasyonu ve lipid peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonu ile oksidatif zararın önlenmesinde önemli bir rol oynarlar (Singh et al. 2001). *M. domestica*'da organofosforlu insektisitlere dirençli mutantların yüksek GST aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Zhou and Syvanen 1997). GST, böceklerde insektisitlerin (Yu 1996) ve konak bitkilerden salınan allelokimyasalların (Yu 1993, Wadleigh 1988) metabolik detoksifikasyonunda, ROT'ların toksik etkilerinden böcekleri korumada (Clark et al. 1985, Ahmad and Pardini 1990, Parkes et al. 1993, Zaman et al. 1994, Vontas et al. 2001), aynı zamanda prostaglandin ve bazı hormonların biosentezinde (Kanaoka et al. 2000) ve hücre içi iyon kanallarının düzenlenmesinde (Dulhunty et al. 2001) önemli role sahiptir. Böceklerde reaktif oksijen türevlerine karşı enzimatik antioksidan savunma sistemleri tiyoredoksin redüktaz (TrxR) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimlerini de içermektedir. Tiyoredoksin ve glutatyon peroksidaz (TPx ve GPx)

substrat olarak glutasyonu kullanır. Fonksiyonel bir glutasyon redüktaz (GR)'den yoksun olan meyve sineği *Drosophila melanogaster* (Meigen) glutasyonu indirgeme olayında tiyoredoksin sistemini kullanılır (Missirlis et al. 2003).

Bazı çalışmalarda çeşitli çevresel stres faktörlerine maruz kalan birkaç böcek türünün biyolojik özelliklerinin iyileşmesi ve ömür uzunluğundaki artışın, lipid peroksidasyonu seviyesinin düşmesi (Sestini et al. 1991) ve antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve glutatona bağımlı antioksidan enzimlerin aktivitelerinin yükselmesi (Sohal et al. 1995, Bains et al. 1998, Sun et al. 2002) ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Uzun süre fenitrotiyona maruz bırakılan lepidoptera takımına ait *Spodoptera exigua* (Hübner)'nin erginlerinde artan SOD aktivitesi ile birlikte yaşama oranının ve ömür uzunluğunun arttığı gözlenmiştir (Adamski et al. 2003). Büyükgüzel et al. (2006) organofosforlu insektisitlerin öldürücü olmayan dozlarına karşı bir adaptasyon tepkisi olarak *Pimpla turionellae* L. erginlerinde SOD aktivitesinin ve ömür uzunluğunun arttığını göstermiştir. Kimyasal mücadelede kullanılan yeni insektisitlerin böcekler üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde yaşama, gelişme, ömür uzunluğu, yumurta verimi gibi biyolojik etkinlik parametrelerinin yanında biyokimyasal ve fizyolojik tepki mekanizmalarının da iyi bilinmesi gerekmektedir. Ekotoksikolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan *Folsomia candida* Willem'e uygulanan tilozin, ampisilin ve oksitetrasiklin gibi farklı bakteri gruplarına etki eden üç antibiyotiğin yüksek dozları yumurta üretimi, açılım oranı ve vücut büyüklüğüne önemli toksik etkiler yapmıştır. Bu antibiyotiklerden oksitetrasiklin en toksik olup böceğin vücut büyüklüğünü azaltmış, en düşük yumurta üretimine neden olmuştur. Böcek yüksek dozda oksitetrasiklin ile muamele edilmesine rağmen bu antibiyotiğe dirençli *Wolbachia* bakterisinin hala hücre içinde bulunduğu tespit edilmiş olup bu durumun böcek tarafından veya böceğin orta bağırsak florası tarafından antibiyotiğin detoksifiye edilmesinden ileri gelebileceği belirtilmiştir. Diğer taraftan ampisilin ve oksitetrasiklin denemelerinde yumurta açılma oranında zamana bağlı olarak bir yükselme görülmüştür. Bu durumun böcek veya barsak florası tarafından bu antibiyotiklerin metabolik olarak uygun bir forma dönüştürmesi sonucu ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Giordano et al. 2010).

Diritromisinin böceğin yaşama, gelişme ve ergin biyolojik özellikleri ile detoksifikasyon kapasitesi üzerine etkilerinin araştırılması, böceklerin mikrobiyal sekonder metabolitleri ile etkileşiminin oksidatif ve antioksidatif düzeyde anlaşılması için bir ışık olacaktır. Şimdiye

kadar diritromisinin besinsel karışımlarının böceklerin biyolojik özellikleri üzerindeki kalitatif ve kantitatif etkileri belirtilmemiştir.

Bu çalışmada yapay besinlere ilave edilen makrolid grubu bir antibakteriyel antibiyotik olan diritromisinin *G. mellonella* 7. evre larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyon ve protein oksidasyonu düzeyleri ile detoksifikasyon enzimi GST aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, ayrıca diritromisinin böceğin yaşama oranı, gelişme süresi, eşey oranı, ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı üzerindeki olumsuz etkilerinin orta bağırsakta bu antibiyotiğin oluşturduğu oksidatif stres ile ilişkisi araştırılacaktır. Böylece larval evrede besinle alınan farklı konsantrasyonlardaki diritromisinin böceğin bazı biyolojik özellikleri üzerindeki etki mekanizmasının oksidatif stres ile ilişkisinin biyokimyasal ve fizyolojik temelleri ortaya konmaya çalışılmıştır.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOT

2.1 GALLERIA MELLONELLA L. KÜLTÜRÜNÜN DEVAMI

Büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) pup ve erginleri Zonguldak ve çevresindeki arıcılardan temin edildi ve bölümümüz laboratuvarında yumurtadan yeni çıkmış larvalar yapay besinde yetiştirilerek stok kültür oluşturuldu. Böcek kültürünün devamı yumurtadan yeni çıkmış larvaların yarı sentetik besinde (Bronskill 1961) aseptik olmayan şartlarda beslenilmesi ile sağlandı. Deneylede böcek tarafından bırakılan yumurtalardan yeni çıkmış larvalar (birinci evre) kullanıldı. Kültür 28 ± 2 °C ve % 65 ± 5 bağıl neme ayarlı bir inkübatörde (Nüve, ES 500) ve gün boyu devamlı karanlıkta yürütüldü.

G. mellonella larvalarını laboratuvar şartlarında yetiştirmek için Bronskill (1961) tarafından geliştirilen öğütülmüş koyu renkli eski bal peteği (kuluçka peteği) içeren yapay besin kullanıldı. *G. mellonella* kültürünün devamı için kullanılan bu besin aynı zamanda diritromisinin böcek üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yürütülen beslenme deneylerinde de kontrol besini olarak 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 sudan oluşmaktadır. Besinin bileşenleri gerekli miktarda tartılarak geniş bir kap içerisinde karıştırıldı ve özel bir karıştırıcı ile homojen bir karışım oluşturuldu. Bu karışım sıvı bileşenlerin katı bileşenler tarafından tam olarak emilebilmesi için 24 saat bekletildi. 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 diritromisinin farklı konsantrasyonları ile ilgili beslenme çalışmaları için gerekli yumurtaların elde edilmesinde kullanıldı.

2.2 DİRİTROMİSİNİN DENEYLERDE KULLANILMASI

Bu çalışmada denenen diritromisin (eritromisilamin, beyaz kristal toz, % 97,8, C₄₂H₇₈N₂O₁₄) (9S(R)-9-deokso-11-deoksi-9,11-(imino (2-(2-metoksietoksi)etiliden) oksii)-ertromisin)) Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A. Ş. (Maslak, İstanbul)'den temin edildi. Diritromisinin besine ilave edilmesi ile yürütülen beslenme deneylerinde denenen miktarların konsantrasyonu 100 gram besin başına gram antibiyotik (% a/a) olarak ifade edildi. Diritromisin, besinin hazırlanması sırasında doğrudan besine ilave edildi. Kontrol besini (diritromisin içermeyen) hariç diritromisinin *G. mellonella* için % 0,001, 0,01, 0,1 ve 1,0 olmak üzere dört farklı konsantrasyonu denendi. Kontrol deneylerinde ise yalnızca diritromisin içermeyen besin kullanıldı. Bu çalışmada denenecek diritromisin konsantrasyonları *G. mellonella* (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009) ve bazı parazitoid böcek türleri (Büyükgüzel 2001, Büyükgüzel ve Yazgan 1996) 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. Diritromisinin *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.

2.3 LARVALARIN ELDE EDİLMESİ

Beslenme deneylerinde kullanılacak *G. mellonella* larvaları, kapaklı, 30 ml'lik geniş ağızlı, vida kapaklı bir plastik kabın (ORLAB, L190030, 35x55 mm) iç yüzeyine dişiler tarafından bırakılan yumurtaların açılması ile elde edildi. Bunun için 2-3 dişi birey, delikli kapakları olan bu plastik kaplara konuldu ve yumurta bırakmaları için stok kültürün devam ettirildiği ortam koşullarında bekletildi. Bırakılan yumurtalar yine aynı ortam şartlarında bekletilerek açılması sağlandı. Yumurtadan yeni çıkan larvaların kaçmasını önlemek için caydırıcı olarak kabın

kapağa yakın iç yüzeyine yaklaşık 1 cm kadar genişlikte gliserin sürüldü. Yumurtaların açılması ile serbest kalan larvalar, 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 YAŞAMA, GELİŞME, EŞEY ORANI VE ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞU İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ

Farklı konsantrasyonlarda diritromisinin ergin evreye kadar *G. mellonella*'nın gelişme süresine ve yaşama oranına etkisini incelemek için öğütülmüş koyu renkli bal peteği içeren Bronskill'in (1961) yapay besini kullanıldı. Diritromisinin denenen miktarları % (a/a) olarak hesaplanıp gerekli miktarları besinlerin hazırlanması sırasında ilave edilerek homojen olarak karışması sağlandı. Daha sonra kontrol besini ve diritromisini içeren diğer besinler uygun besin kaplarına (Cam kavanozlar, 60 x120 mm) taksim edildi. Her bir besin için 20 larva kullanıldı ve deneyler dörder defa tekrarlandı. Larvalar farklı konsantrasyonlarda diritromisin içeren besinlere bırakıldıktan sonra gelişimlerini tamamlayan olgun *G. mellonella* larvaları (7. evre larvalar) alınarak pup olmak üzere 30 ml'lik plastik örnek kaplarına (ORLAB, L190030, 35x55 mm) her kapta bir larva olacak şekilde bırakıldı. Bu kapların içerisine larvaların pup olması için ortam sağlamak üzere katlanmış, ince pelur kağıt bırakıldı. Bu larvalardan pup olan ve erginleşen bireylerin oranı ve bu evrelere ulaştıkları süre belirlendi. Erginleşen bireylerin erkek ve dişi oranı ve ömür uzunlukları belirlendi. Denemede kullanılan erginlerin eşey ayrımı, erginlerinin vücut büyüklüğüne ve abdomenlerinin son segmentindeki genital yapıya göre yapıldı.

Farklı konsantrasyonlarda diritromisinin ergin bireylerin yaşama süresine (ömür uzunluğu) etkisini belirlemek için yumurtadan yeni çıkmış *G. mellonella* larvaları diritromisinin miktarlarını içeren yapay besinler ile ergin evreye kadar beslendi. Her bir deney 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 için deney süresince herhangi bir besin verilmedi. Bu erginler stok kültürün devam ettirildiği ortam şartlarında bırakıldı. Erginler, her gün belirli saatte kontrol edilerek en son erginin ölümüne kadar her erginin yaşama süresi belirlendi.

2.5 DIŞİLERİN YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI İLE İLGİLİ DENEYLER

Farklı konsantrasyonlarda diritromisinin sentetik besinle yetiştirilen *G. mellonella* dişilerinin yumurta verimine etkisini incelemek için yumurtadan yeni çıkan larvalar bu antibiyotığın farklı miktarlarını içeren yapay besinler ile ergin evreye kadar beslendi. Yumurta verimi için yeni erginleşmiş ve döllenmemiş bir günlük dişiler kullanıldı. *G. mellonella* dişileri geniş ağızlı, delikli kapaklı, plastik kaplara (15 ml, ORLAB) her kapta bir adet dişi olacak şekilde bırakıldı. *G. mellonella*'nın erginleri besin almadığı (Charrière and Imdorf 1997) için bu dişilere yumurta bırakma süresi içerisinde herhangi bir besin verilmedi. Dişiler tarafından 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. Yumurta üretimi, bir günde dişi başına bırakılan yumurta sayısı ele alınarak değerlendirildi ve dişinin verimliliği olarak ifade edildi. Her gün açılan larvalar yine siyah bir zemin üzerinde sayılarak ortalama sayısı kaydedildi ve yumurtaların açılma oranı (fertilite) tespit edildi. Her bir deney için 10 adet dişi kullanıldı ve deneyler dörder defa tekrarlandı.

Kontrol ve diritromisin konsantrasyonlarının *G. mellonella* üzerindeki etkisinin araştırıldığı deneylerin hepsinde larvaların aşılандığı besin kapları ve olgun larvaların pup olmaları için hazırlanan kaplar kısa bir günlük inceleme periyodu hariç sürekli olarak karanlıkta tutuldu. Besinin hazırlanması ve larvaların aşılınması hariç beslenme deneylerinin tümü böceklerin stok kültürünün yetiştirildiği şartlarda yürütüldü. Besinin hazırlanması, yumurtaların elde edilmesi, bu yumurtalardan çıkan larvaların besine aşılınması işlemleri tamamen aseptik olmayan şartlarda yapıldı (İçen et al. 2005, Büyükgüzel et al. 2007, 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 temel alındı ve bir ölçüde değiştirilerek uygulandı. Birçok lepidopter türünün birinci evre larvalarında olduğu gibi *G. mellonella* larvalarının da ilk evrelerinde besin ortamında ölüm oranının yüksek olduğu, ölen larvaların içlerinin boş olarak kurduğu ve göz ile görülemediği için besine aşılınan her bir larvanın olgun evreye ulaşmaya kadar günlük olarak takip edilmesi mümkün olamamıştır (Zalucki et al. 2002). Bu yüzden farklı evrelerdeki yaşama oranı tespit edilirken deney süresince yaşayan larva sayısı olarak, besine başlangıçta aşılınan larvaların sayısı dikkate alındı.

2.6 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ

Farklı konsantrasyonlarda diritromisini içeren besinler ile yetiştirilen *G. mellonella* 7. evre larvalarının izole orta bağırsak dokusunda lipid peroksidasyon ürünü MDA ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil miktarları ile GST aktivitesi ölçüldü. Deneyler her bir tekrarda 15 ortabağırsak kullanılarak dörder defa tekrarlandı.

2.6.1 Orta Bağırsak İzolasyonu

G. mellonella'nın yumurtadan yeni çıkan larvaları diritromisinin belirlenen konsantrasyonlarını içeren besinler ile 7. evreye kadar yetiştirildi. Lipid peroksidasyonu ürünü, MDA ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil miktarları ile antioksidan enzim GST aktivitesi 7. evre larvalarının orta bağırsağında belirlendi. Larvalar buz üzerinde 5 dk bekletildikten sonra % 95 etil alkol ile yüzeyleri dezenfekte edildi ve parafinle doldurulmuş petri kabına sırt kısmı parafine gelecek şekilde sabitlendi. Daha sonra larvalar birinci çift torasik bacakların önünden itibaren üçüncü abdominal bacak çiftine kadar uzunlamasına karın kısmından orta eksen boyunca ince uçlu diseksiyon makası ile kesildi ve stereomikroskop (Olympus SZ61, Tokyo, Japan) altında ince uçlu bir pens ile sindirim kanalı çıkarıldı. Üç bölümden oluşan sindirim kanalından orta bağırsak ön ve son bağırsaktan ayrılarak alındı. Orta bağırsağa tutunmuş yağ doku, Malpiki tüpçükleri ve bağırsak içeriği uzaklaştırıldı. Alınan orta bağırsaklar, soğuk homojenizasyon tamponu [% 1,15'lik potasyum klorür (KCL) a/h, 25 mM dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), 5 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenilmetilsülfonil (PMSF), 2 mM ditiyotritol (DTT), pH: 7,4] bulunan bir ependorf tüpe alındı. Muhtemel fenol oksidaz aktifliğini önlemek için tüplere birkaç feniltiyöre kristali konuldu. Örnekler analiz yapılmaya kadar derin dondurucuda (-80 °C) saklandı.

2.6.2 Malondialdehid (MDA)

Jain ve Levine (1995)'nin kullandığı metod temel alınarak 532 nm'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren lipid peroksidasyonun son ürünü MDA miktarı ölçüldü. Orta bağırsak % 1,15'lik KCl ile ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile parçalandı. Homojenize edilen örnekler pH 7,4 olan fosfat tamponu (18 mM NaCl, 18 mM Na₂HPO₄), 0,04 M butillenmiş hidroksi toluen (BHT), %

30'luk triklorasetik asit (TCA)] eklenerek 2 saat buzun içerisinde bekletildikten 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, daha sonra 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 verildi.

2.6.3 Protein Karbonil

Protein karbonil tayini Levine (1994)'in metodu temel alınıp bir ölçüde değiştirilerek (Krishnan and Kodrik 2006) kuvvetli asit ortamda proteinlerdeki karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları kararlı bileşik 2,4-dinitrofenilhidrazonun 370 nm'de miktarı ölçüldü. Örnekler, homojenizasyon tamponunda [% 1,15'lik potasyum 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)] ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile + 4 °C'de parçalandı. Elde edilen özüt + 4 °C'de 1000 x g'de 10 dk santrifüj (Hettich Zentrifugen, Mikro 200 R soğutmalı santrifüj) edildi. Üst sıvı alınıp % 10'luk streptomisin sülfat ilave edilerek 37 °C'de 15 dk benmaride bekletildi. Daha sonra 8000 x g'de + 4 °C'de santrifüj edilerek nükleik asitler çöktürüldü. Üst sıvıdan 200 µl alınarak üzerine 800 µl 10 mM 2,4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) eklendi. Oda ısısında bir saat veya benmaride 37 °C'de 15 dk belirli aralılar ile çalkalamak suretiyle beklendi. 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 santrifüj edildi. Böylece oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazon bileşikleri çöktürüldü. Üst sıvı atılarak çöküntü üzerine 1:1 oranında 1 ml etanol: etil asetat karışımı ilave edildi ve 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 çöküntü çözüldü. Bu homojen çözeltiden 150 µl alınarak toplam protein analizinde kullanıldı. Karışımın diğer bölümü çözünmeyen kaba partiküllerin çökmesi için 10000 x g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Üst sıvının absorbansı 370 nm de kör tüpe karşı spektrofotometrede (Shimadzu 1700 UV/Vis, Kyoto, Japan) okunarak protein karbonil miktarı $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak verildi.

Protein karbonil analizi yapılan örneklerdeki toplam protein tayini için 6 M guanidin hidroklorür ile çözülen çöküntüden alınan 150 µl karışım 1350 µl guanidin hidroklorür ile 1:10 oranında sulandırıldı. Örneğin absorbanı 280 nm'de ölçüldü. 6 M guanidin hidroklorür ile hazırlanan Bovin serum albumin (BSA) standart çözeltileri (12,5-1600 mg/100ml) ile standart grafik oluşturularak toplam protein miktarı bu grafiğe göre hesaplandı.

2.6.4 Glutasyon S-transferaz (GST)

Örnekler +4 °C'de ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) (10 sn, 30 W) homojenize edildi. Enzim inaktivasyonunun önlenmesi için homojenizasyon dahil tüm işlemler buz ile sağlanan soğuk ortamda yapıldı. Homojenize edilen örnekler, +4 °C'de 16000 x g devirde soğutmalı santrifüjde 20 dakika santrifüj edildi. Çöküntü atılarak üst sıvılar GST aktivitesinin ölçümünde kullanıldı. GST aktivitesinin ölçümünde Habig vd. (1974) tarafından geliştirilen metod uygulandı. GST'nin bütün izozimleri için 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) yaygın bir substrattır. CDNB 340 nm'de yükselen absorbanı gösteren glutasyon oksidasyonunu katalizleyen GST enzimi için substrat olarak kullanıldı. Bu enzimin aktivitesinin ölçülmesi için 3 ml'lik cam küvetlere 2,5 ml 50 mM fosfat tamponu, 200 µl 20 mM redükte glutasyon ve 150 µl süpernatant ilave edildi. Enzimatik reaksiyon bu karışıma 150 µl 25 mM CDNB eklenerek başlatıldı ve 2 dakika boyunca yükselen absorbanlar okundu. Yükselen absorbanı CDNB'nin redükte glutasyon ile reaksiyona girerek tiyoether yapısının oluşumunu göstermektedir. Enzim aktivitesi 340 nm'de (ϵ_{340} : 0,0096 $\mu\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}$) süpernatantta bulunan 1 mg toplam protein başına 1 dakikada oluşturulan tiyoether miktarı olarak ölçüldü ve enzimin spesifik aktivitesi $\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{dk}$ olarak verildi.

(GST)

GSH + ksenobiyotik ----- ksenobiyotik – GSH konjugasyonu

Orta bağırsak örneğinden elde edilen süpernatanttan GST'nin spesifik aktifliğini hesaplamak ve MDA miktarını mg protein başına vermek için çözünür toplam protein tayini yapıldı. Bu amaçla örneklerin absorbanı spektrofotometrede 600 nm'de Folin-Lowry (Lowry et al. 1951) metoduna göre ölçülerek total protein miktarı tespit edildi. Bu hesaplamayı yapmak için öncelikle farklı konsantrasyonlarda standart protein olarak, bovin serum albumini (BSA) çözeltileri hazırlandı ve bir standart grafik oluşturuldu. Total protein miktarları bu standart grafiğe göre hesaplandı.

2.7 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Diritromisinin farklı miktarlarını içeren besinlerin böcek üzerindeki etkisi 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 alınarak değerlendirildi. Ergin eşey oranına etkisi erginleşen erkek ve dişi bireylerin yüzdesi dikkate alınarak değerlendirildi. Ergin bireylerin ömür uzunluğu süresine etkisi erginleşen dişi ve erkek bireylerin hayatta kaldıkları gün olarak ortalama süre (ömür uzunluğu) belirlenerek değerlendirildi. Dişilerin verimliliği üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde ise bırakılan yumurta sayısı ve açılma oranı dikkate alındı. Farklı konsantrasyonlarda diritromisinin böceğin detoksifikasyon kapasitesine, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeyi üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde ise orta bağırsaktaki 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 “ χ^2 (Chi square) Testi” (Snedecor and Cochran 1989) kullanıldı. Ortalamaların önemi 0,05 olasılık seviyesinde değerlendirildi.

BÖLÜM 3

ARAŞTIRMA BULGULARI

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

Diritromisin içermeyen kontrol besine göre diritromisinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler 7. evreye ulaşan larva oranını, pup ve ergin olma oranını önemli derecede düşürmüştür. Kontrol besininde % $81,9 \pm 4,11$ oranında ergin elde edilmesine rağmen % 0,01 oranında diritromisin içeren besin bu oranı % $68,0 \pm 4,10$ 'a önemli derecede indirmiştir. Denenen en yüksek diritromisin konsantrasyonu (%1,0) ise ergin olma oranını % $15,2 \pm 3,63$ 'e düşürmüştür. Diritromisinin bu besinsel oranı 7. evreye, pup ve ergin evrelerine ulaşmak için gereken süreyi önemli derecede uzatmıştır. Bu besinle beslenen larvalar kontrol grubuna göre ortalama 4 gün daha geç pup evresine ulaşırken ergin evrede bu gecikme 2 gün olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Diritromisin içermeyen kontrol besininden % $81,9 \pm 4,11$ oranında ergin elde edilmiş olup bu erginlerin % $43,1 \pm 5,53$ 'i erkek, % $38,8 \pm 7,08$ 'i dişidir. Diritromisinin denenen düşük konsantrasyonlarını içeren besinler erkek ve dişi birey oranını etkilememiştir. Buna karşılık, diritromisinin en yüksek konsantrasyonu olan % 1,0'ini çeren besin erkek oranını % $5,5 \pm 0,00$, dişi oranını % $9,7 \pm 3,60$ 'ye düşürmüştür (Çizelge 3.1).

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

Diritromisin (%)	7.evreye ulaşan larva oranı (%)	7.evreye ulaşma süresi (gün)	Pup olma oranı (%)	Pup olma süresi (gün)	Ergin olma oranı (%)	Ergin olma süresi (gün)	Eşey oranı (%)	
	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	(Ort* ± S.H)†	Erkek (Ort* ± S.H)†	Dişi (Ort* ± S.H)†
0,000 [§]	94,4 ± 3,40a	20,9 ± 0,75a	91,6 ± 3,10a	24,8 ± 0,19a	81,9 ± 4,11a	32,9 ± 0,74a	43,1 ± 5,33a	38,8 ± 7,08a
0,001	81,9 ± 3,02b	20,2 ± 0,26a	76,3 ± 4,10b	25,5 ± 0,47a	72,1 ± 7,08ab	32,4 ± 0,46a	37,4 ± 5,33a	34,7 ± 4,10a
0,01	77,7 ± 3,40b	20,2 ± 0,39a	76,3 ± 4,10b	25,7 ± 0,55a	68,0 ± 4,10b	32,6 ± 0,63a	34,7 ± 4,95a	33,3 ± 5,55a
0,1	73,6 ± 3,60b	19,9 ± 0,72a	68,0 ± 3,60b	24,8 ± 0,72a	63,7 ± 3,10b	32,1 ± 0,55a	38,8 ± 3,92a	24,9 ± 4,16ab
1,0	18,0 ± 4,55c	22,9 ± 0,61b	16,6 ± 4,81c	29,2 ± 1,64b	15,2 ± 3,63c	35,2 ± 0,78b	5,5 ± 0,00b	9,7 ± 3,60b

* 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 (Diritromisin içermeyen).

3.2 DİRİTROMİSİNİN *G. MELLONELLA*'NİN ÖMÜR UZUNLUĞU, YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ETKİSİ

Diritromisin içermeyen kontrol besini ile karşılaştırıldığında diritromisinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler erkek ve dişi erginlerin ömür uzunluğu üzerinde önemli derecede etkili olmamıştır. Diritromisinin % 0,001'lik konsantrasyonu erkeklerin ömür uzunluğunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 gün uzamaya sebep olsada bu etki istatistiksel olarak önemli olmamıştır. Benzer önemli olmayan bir etkiyi diritromisinin % 0,01'lik konsantrasyonu dişi ömür uzunluğu üzerinde göstermiştir (Çizelge 3.2).

Kontrol besine göre, diritromisinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler yumurta verimini önemli derecede düşürmüştür. Kontrol besininden elde edilen dişilerden $83,4 \pm 0,89$ yumurta elde edilmiş olup bu sayı % 0,001'lik diritromisin konsantrasyonu tarafından $66,6 \pm 5,74$ 'ya düşürülmüştür. Buna karşılık diritromisinin denenen en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) ile yetiştirilen dişilerin yumurta verimi önemli derecede azalmış olup yumurta sayısı dişi başına bir günde $32,6 \pm 2,82$ 'ya düşmüştür. Diritromisin içermeyen kontrol besine göre, diritromisinin denenen düşük konsantrasyonları yumurtaların açılma oranını önemli derecede etkilememiştir. Diritromisin içermeyen kontrol besini ile yetiştirilen dişilerin bıraktığı yumurtaların % $72,5 \pm 4,82$ 'i açıldığı halde diritromisinin en yüksek konsantrasyonu bu açılma oranını % $33,7 \pm 9,97$ 'ye düşürmüştür (Çizelge 3.2).

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

Diritromisin (%)	Ergin ömür uzunluğu (gün)		Yumurta verimi (yumurta/gün/dişi) (Ort* ± S.H)†	Açılma oranı (%) (Ort* ± S.H)†
	Erkek (Ort* ± S.H)†	Dişi (Ort* ± S.H)†		
0,000 [§]	7,8 ± 0,41a	9,9 ± 0,23a	83,4 ± 0,89a	72,5 ± 4,82a
0,001	10,2 ± 1,67a	9,7 ± 0,75a	66,6 ± 5,74b	63,4 ± 4,95a
0,01	9,0 ± 0,29a	11,3 ± 1,32a	38,6 ± 5,46bc	78,9 ± 5,45a
0,1	8,1 ± 0,44a	9,6 ± 1,18a	52,0 ± 4,43b	62,4 ± 8,08a
1,0	7,2 ± 0,41ab	8,5 ± 1,25a	32,6 ± 2,82bc	33,7 ± 9,97b

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

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

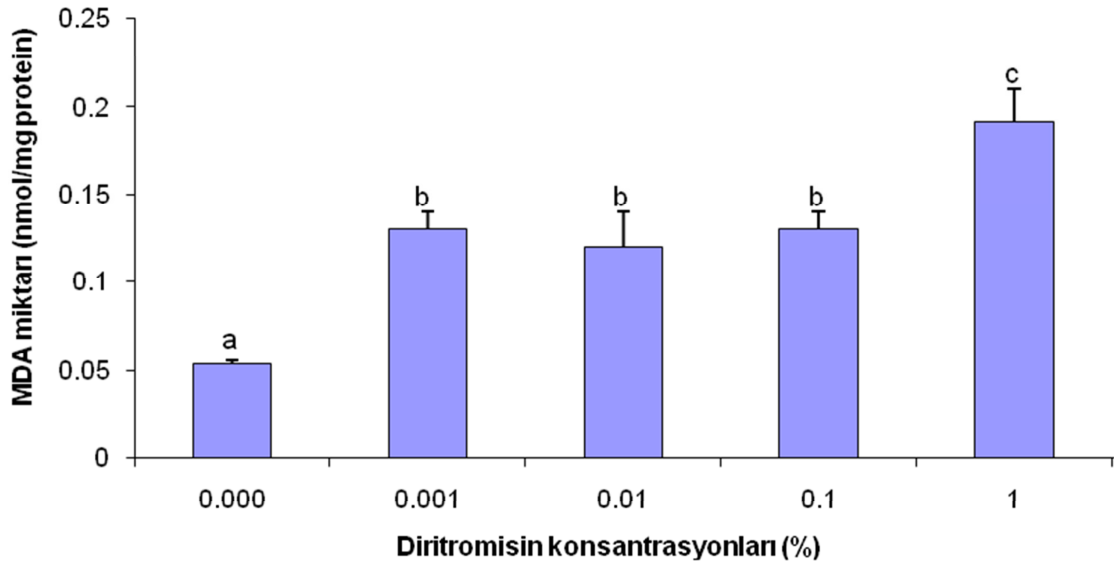
§ Kontrol besini (Diritromisin içermeyen).

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

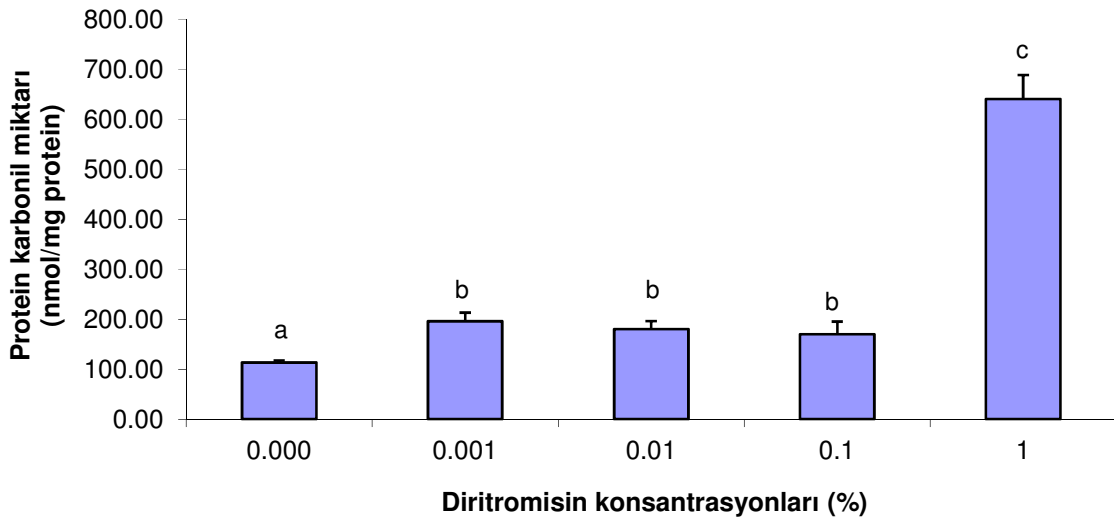
Kontrol besine göre diritromisinin denenen konsantrasyonları 7. evre larvalarının orta bağırsak MDA miktarını önemli derecede artırmıştır. Denenen en düşük konsantrasyon olan % 0,001'lik diritromisin kontrole göre MDA miktarını yaklaşık 2,5 katı oranında artırmıştır. Diritromisinin % 0,01 ve 0,1'lik konsantrasyonları da orta bağırsak MDA miktarı üzerine benzer etkiyi yapmıştır. Diritromisinin denenen en yüksek miktarını (% 1,0) içeren besin MDA miktarını $0,054 \pm 0,002$ nmol/mg protein'den $0,19 \pm 0,02$ nmol/mg proteine yaklaşık 3,5 katı oranında önemli derecede yükseltmiştir (Şekil 3.1).

Kontrol besini ile yetiştirilen larvaların orta bağırsağında protein karbonil miktarı $113,53 \pm 4,4$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Kontrol besini ile karşılaştırıldığında % 0,001'lik diritromisin protein karbonil miktarını $195,98 \pm 17,6$ nmol/mg protein'e önemli derecede artırmıştır. Diritromisinin % 0,01 ve 0,1'lik konsantrasyonları da protein karbonil miktarını sırasıyla $180,10 \pm 16,3$ ve $170,07 \pm 25,4$ 'e yükseltmişlerdir. Diritromisinin en yüksek konsantrasyonunu içeren besin protein karbonil miktarını yaklaşık 6 katı oranında artırarak $640,84 \pm 48,2$ yükseltmiştir (Şekil 3.2)

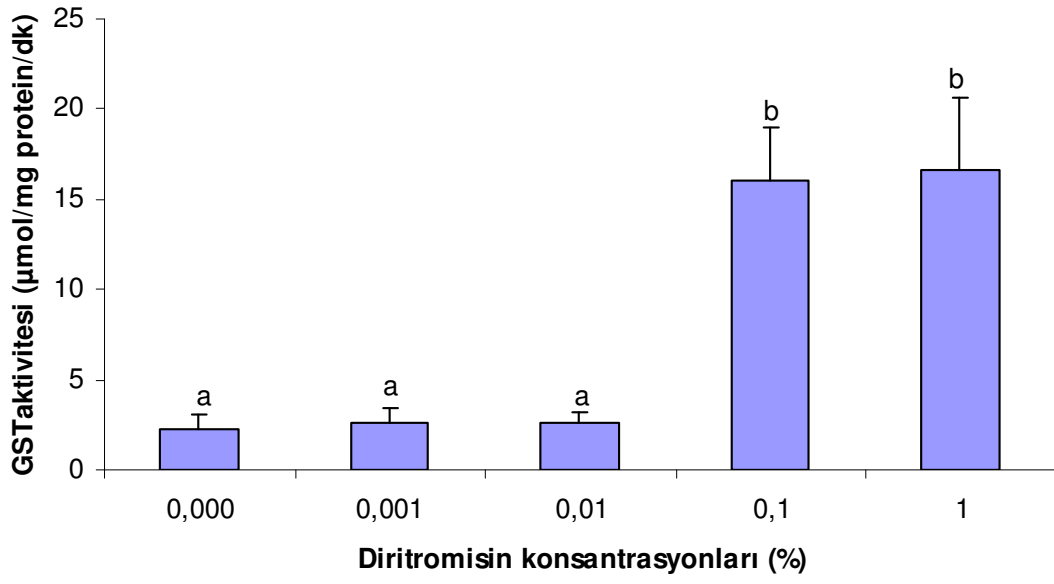
Diritromisin içermeyen kontrol besininde orta bağırsak GST aktivitesi $2,24 \pm 0,8$ μ mol/mg protein/dk olarak bulunmuştur. Kontrol besini ile karşılaştırıldığında % 0,001 ve 0,01'lik diritromisin konsantrasyonları GST aktivitesinde artışa sebep olmalarına rağmen istatistiksel olarak önemli derecede etkili olmamıştır. Buna karşılık, % 0,1 ve 1,0'lik diritromisin konsantrasyonları GST aktivitesini önemli derecede artırmıştır. Bu konsantrasyonları içeren besinler GST aktivitesini kontrole göre 7 katı oranında artırmıştır. Bu besinler GST aktivitesini sırasıyla $16,01 \pm 3,0$ ve $16,68 \pm 4,0$ μ mol/mg protein/dk'ya kadar artırmışlardır (Şekil 3.3).



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



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



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

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Böcekler bazı bakteri ve küfler tarafından salgılanan antimikrobiyal maddeler ile doğal ortamlarında karşılaşabilecekleri düşünüldüğünde antimikrobiyal maddelerin zararlı böceklerin yaşam parametreleri ile ilişkili olarak oksidatif etkilerinin tamamen anlaşılması böceklerin çevreleri, besinleri ve konakları ile ekolojik ilişkilerinin anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu çalışmada Pyralidae ailesine ait olan büyük bal mümü güvesi *G. mellonella* model alınarak ülkemizde tarımsal ürünlere zarar veren öncelikle Pyralidae ailesine ait türlerin ve genelde diğer zararlı türlerin kimyasal mücadelesinde antibiyotiklerin besinsel karışımlarının kullanılabilirliğinin Laboratuvar şartlarında araştırılması amaçlanmıştır. Geleneksel antibiyotiklerin besinsel karışımlarının etkileri *G. mellonella* üzerinde denenmiş olup (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009) yeni nesil bir makrolid olan diritromisinin böceğin oksidatif etkisi ile detoksifikasyon kapasitesine etkisi çalışılmamıştır. Dünyada ve ülkemizde tarım alanındaki zararlılar ile mücadele ederek daha kaliteli ürün elde etmek amacıyla geniş etkili kimyasal insektisitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Tarımsal alanda kullanılan bu insektisitler hedef organizmaları yok ederek ürün artışına neden olduğu gibi hedef olmayan canlılara da zarar vermektedir. Tarım bitkileri zararlısı böcekler ile mücadelede Lepidoptera takımına ait türlerin laboratuvarında yapay ortamlarda yetiştirilme çalışmaları yeni pestisitlerin geliştirilmesi ve keşfedilmesi doğrultusunda büyük bir hızla artmakta olup bu amaçla farklı model böcek türleri ve beslenme teknikleri kullanılmaktadır.

Lepidoptera takımına ait büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* larvalarını laboratuvarında ergin evreye kadar yetiştirmek için kullanılan yapay besine farklı miktarlarda katılan bir makrolid türevi antibiyotik olan diritromisinin böceğin yaşama oranı, gelişme süresi, eşey oranı, ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı ile son evre (7. larval evre) larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyonunun önemli bir ürünü olan MDA ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil miktarlarına, detoksifikasyon enzimi GST aktivitesine etkisi incelendi. Bu çalışmanın sonuçları diritromisinin denenilen yüksek

besinsel konsantrasyonlarının çalışılan beğin biyolojik özellikleri ve antioksidan savunma sistemini olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Benzer biyolojik tepkiler diğer geleneksel antibiyotikler (penisillin ve streptomisin) ile maruz kalan *Galleria mellonella* (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009) ve diğer bazı böcekler için de kaydedilmiştir (Büyükgüzel ve Yazgan 1996, Büyükgüzel 2001, Giordano et al. 2010).

Antibiyotikler, böceklerin yapay besinler ile yetiştirilmesi sırasında muhtemel bakteriyel ve fungal kontaminasyonları önlemek, besin almalarını uyarmak ve büyümelerini hızlandırmak amacıyla besinlere ilave edilmektedir. Bazı çalışmalarda çeşitli amaçlar ile kullanılan antibiyotiklerin, beğin yaşama oranı ve gelişme süresine etki etmeyen ancak kontaminasyonu önleyebilen besinsel miktarları belirlenmiş olup, böcek üzerinde olumsuz etkilere sahip olan miktarlarının ise etki mekanizması üzerinde durulmamıştır (Liles 1958, Singh and House 1970, Griffiths and Beck, 1974, Costa et al. 1997, Büyükgüzel ve Yazgan 2002, Alverson and Cohen 2002). *B. thuringiensis* subsp. Kurstaki HD-1 toksini *Lymantria dispar* larvalarında düşük oranda lme sebep olurken larvaların antibiyotik ile beslenmesi sonucunda orta bağırsak bakterileri yok edildiğinde beğin toksinden dolayı ölüm oranı artmaktadır. Auremisin ve ampisilin ile beslenmiş *L. dispar* larvalarının ölüm oranı bu larvalara inoküle edilen *B. thuringiensis* toksini tarafından doza bağlı olarak artırılmıştır (Frankenhuyzen et al. 2010). Antibiyotik ile beslenen Lepidopter türler *L. dispar*, *Choristoneura fumiferana* gibi mikrofloraya sahip böceklerin toksine hassasiyeti artmıştır. Antibiyotiklerin *G. mellonella* zerine etkilerinin incelendiği önceki çalışmalarda orta bağırsağın antibiyotiklere karşı artan hassasiyetin orta bağırsaktaki fizyolojik işlevlerin değişmesine bağlı olduğu belirtilmiştir (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2009). Böceklerin orta bağırsağının besinlerin parçalanması ve sindirimi sırasında meydana gelebilecek oksidatif hasara karşı oldukça hassas olduğunun bilinmesine rağmen (Krishnan and Kodrik 2006), böceklerin sindirim dokusunda antibiyotiklere karşı biyokimyasal stres belirteci olarak oksidatif ve antioksidatif tepki mekanizmaları hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2009). Bu çalışmaların sonuçları denenen besinsel antibiyotiklerin beğin yaşama oranı ve gelişme süresi üzerindeki olumsuz etkilerinin larvaların ortabağırsağına ulaşan antibiyotikler ile doğrudan uyarılan oksidatif hasara bağlı olabileceğini desteklemektedir. Diritromisin ile yapılan bu çalışmada bu görüşü destekleyen önemli sonuçlar elde edilmiştir. Birincisi, diritromisinin farklı miktarlarını içeren besinler ile beslenen *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında oksidatif stresin göstergesi olan lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeyi önemli derecede yüksek bulunmuştur. İkinci

olarak, denenen diritromisin konsantrasyonları önemli bir detoksifikasyon enzimi olan GST aktivitesinde önemli artışa sebep olmuştur. Bu sonuçlar besinsel diritromisin konsantrasyonlarının böceğin biyolojik parametreleri üzerindeki olumsuz etkilerinin, antibiyotiğin prooksidatif etkisine bağlı olabileceğini göstermiştir. Bu durum böceğin orta bağırsak fizyolojisini değiştirerek larvaların besinden yararlanmasını olumsuz yönde etkilemiş olabileceğinden böcek yaşama ve gelişimi için gerekli olan besinsel ihtiyacı karşılayamamış olabilir. Bu çalışmada ayrıca diritromisinin *G. mellonella* üzerinde 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 diritromisinin 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 antibiyotik kullanılabilir. Diritromisinin bu yönü ile incelenmesinde ilave çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Aynı türün farklı gelişim evrelerinde bile değişik fizyolojik koşullara gereksinim duyulduğu bilinmektedir (Grenier et al. 1986). Bu yüzden denenen diritromisinin besinsel karışım halinde etkisinin böceğin farklı ergin özelliklerine göre değişmesi de beklenen bir sonuçtur. Bunun yanında herhangi bir insektisit uygulama yöntemi, formülasyonu ve insektisit etkinliği de önemlidir (Appel et al. 2004). Bu çalışmada diritromisinin böcek üzerindeki etkisi uygulanan farklı konsantrasyonları ile değişmiştir. Diritromisinin yalnızca en yüksek konsantrasyonunu içeren besin böceğin yaşama oranını azaltmış, gelişme süresini uzatmış, erkek ve dişi eşey oranı ile yumurta açılma oranını düşürmüştür. Diritromisinin denenen tüm konsantrasyonları böceğin gelişme evrelerindeki yaşama oranı ile dişilerin yumurta verimini düşürmüştür. Diritromisinin erkek ve dişi ömür uzunluğuna önemli bir etkisi olmamıştır.

Diritromisin kontrol besinine göre *G. mellonella* son evre larvalarının orta bağırsak MDA ve protein karbonil miktarını önemli derecede artırmıştır. Kontrol besine % 1,0 diritromisin ilave edilmesi oksidasyon düzeyini artırarak kontrole göre MDA seviyesinde 3,5 katı, protein

karbonil miktarında ise 6 katı artışa sebep olmuştur. Besindeki yüksek diritromisin konsantrasyonları (% 0,1 ve 1,0) GST aktivitesinde yaklaşık 7 katı oranında bir yükselmeye sebep olmuştur. *G. mellonella* larvalarının besinine ilave edilen antibiyotiklerin böceğin yaşama, gelişme, vücut ağırlığı ve total protein miktarına etkisi böceğin gelişme evreleri (larva, pup ve ergin) ile antibiyotiklerin türü ve dozuna bağlı olduğu bilinmektedir (Büyükgüzel and Kalender, 2008). Antibiyotiklerin *G. mellonella* larvalarının orta bağırsak MDA ve antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, GST, GPx) aktiviteleri üzerine etkilerinin böceğin larval evreleri (3-7 evreler) ile denenen antibiyotik türü ve konsantrasyonlarına göre değiştiği belirtilmiştir (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008). Yüksek konsantrasyonlarda penisilin (% 0,01, 0,1 ve 1,0) *G. mellonella*'nın 7. evre larvalarının, pup ve erginlerin yaş ağırlığını artırmış, flukonazol, griseofulvin ve streptomisin ise düşük miktarları (% 0,001 ve 0,01) böceğin yaş ağırlığını artırmıştır. Bu antifungal ve antibakteriyel maddeler erginlerin total protein miktarını düşürmüştür. Penisillinin ve streptomisin % 1,0'lik konsantrasyonunu içeren besinler kontrole göre (% 80) *G. mellonella*'nın pup ve ergin yaşama oranını % 50 oranında azaltmış olup, flukonazol ve griseofulvinin yüksek miktarlarını içeren besinlerden % 20 gibi düşük bir oranda ergin elde edilmiştir. Bu antibakteriyel ve antifungal maddeler gelişme süresini önemli derecede uzatmış olup özellikle flukonazolun bazı konsantrasyonlarında ergin evreye ulaşma süresi 8 gün uzamıştır (Büyükgüzel and Kalender 2008).

Penisillinin yüksek konsantrasyonlarını içeren besinler ile beslenen *G. mellonella* larvalarının tüm evrelerinde (3-7. evreler) orta bağırsak MDA miktarı önemli derecede yükselmiştir. Diğer taraftan yüksek penisilin konsantrasyonlarında 7. evre larvalarının orta bağırsağında MDA miktarının arttığı SOD ve GST aktivitelerinin önemli derecede düştüğü gözlenmiştir (Büyükgüzel ve Kalender 2007). Buna karşılık streptomisin yüksek besinsel konsantrasyonları bu böceğin 7. evre larvalarında lipid peroksidasyonu düzeyi ile birlikte antioksidan enzimler SOD ve GPx düzeylerini artırırken CAT ve GST aktivitesini düşürmüştür (Büyükgüzel and Kalender 2009). Antibiyotiklerin böcek üzerindeki patofizyolojik etkilerinin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber bazı antibiyotiklerin çeşitli hayvan modellerinde oksidatif strese sebep olmak üzere reaktif oksijen radikallerini oluşturduğu ve böylece hücre zarına zarar verdiği belirtilmiştir (Vijayalekshmy et al. 1992, Kovacic and Osuna 2000). Serbest radikallerin antioksidan savunma sistemini bozarak Lepidoptera takımına ait *Spodoptera littoralis* (Boisduval) larvalarının ön ve orta bağırsağında lipid peroksidasyonu düzeyini artırdığı bilinmektedir (Krishnan and Kodrik

2006). Bu sonuçlar ile uyumlu olarak diritromisin *G. mellonella* son evre larvalarının orta bağırsak dokusunda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu artırmakla birlikte GST aktivitesini de yükseltmiştir.

Larval evrede alınan doğal ve yapay besin maddelerinin kalitesi ve besinsel dengesi bir çok böceğin erginlerinin üreme ve diğer bazı özellikleri ile ömür uzunluğu (hayatta kalma süresi) üzerinde etkilidir (Slansky and Scriber 1985, Eischen and Dietz 1987, Ridgway and Mahr 1990). Zararlı bir dipter tür olan Akdeniz meyve sineği *C. capitata*'nın larval evrede aldığı besinin ergin oluşumunu, vücut büyüklüğünü, eşeyssel olgunluğu, yumurta bırakma davranışını ve yaşama süresini etkilediği bilinmektedir (Chang et al. 2001). Diritromisinin denenen besinsel karışımlarının hiç biri *G. mellonella* erkek ve dişi erginlerinin ömür uzunluğu üzerinde istatistiksel olarak etkili olmamıştır. *G. mellonella*'nın ergin ömür uzunluğu mevsime (kış ve yaz ayları) göre değişmekte olup eşey oranları ise her mevsimde 1:1,1 (populasyon içi paylar %50: % 55) oranındadır (Chang and Hsieh 1992). Bu çalışmada erkek ve dişi bireylerin ömür uzunluğu ayrı ayrı ele alınmıştır. Kılınçer (1976)'de, yapmış olduğu çalışmasında belirli bir doğal konak ile yetiştirilen *Bracon hebetor* (Say) erginlerinden erkek bireylerin dişilere göre daha kısa yaşadığını, erkek bireylerin ömür uzunluğunun ortalama $7,4 \pm 2,6$ (4-14) gün, dişi bireylerin ömür uzunluğunun ise ortalama $19,7 \pm 2,6$ (10-30) gün olduğunu belirtmiştir. Bu sonuçlar, çalıştığımız böceğin Lepidoptera takımına ait bir tür olmasına rağmen elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Diritromisinin en düşük konsantrasyonu (% 0,001) hariç kontrol ve diritromisinin denenen diğer konsantrasyonlarının tümünde *G. mellonella* erkekleri dişilerden daha kısa süre yaşamışlardır. Bu besinlerde dişilerin erkeklere göre daha uzun yaşaması dişilerin larval besin ile alınan yüksek konsantrasyonlarda diritromisine ergin sonrası daha fazla tolerans göstermesi sonucu olabilir.

Bazı çalışmalarda çeşitli çevresel stres faktörlerine maruz kalan birkaç böcek türünün ergin ömür uzunluğundaki artışın lipid peroksidasyonu düzeyinin düşmesi (Sestini et al. 1991) ve antioksidan enzimlerden SOD, CAT ile glutatyona bağımlı enzimlerin aktivitelerinin yükselmesi (Bains et al. 1998, Sun et al. 2002) ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Daha önceki çalışmalarda bazı antibiyotiklerin denenen yüksek konsantrasyonlarında (% 0,1 ve 1,0) *G. mellonella* larvalarının orta bağırsak MDA miktarında artış gözlenirken, GST ve diğer antioksidan enzimlerin aktiviteleri artmıştır. Ancak bu antibiyotiklerin *G. mellonella* son evre larvalarının orta bağırsağındaki oksidatif ve antioksidatif düzeyine etkisi ile ilişkili olarak

böceğin ömür uzunluğu üzerine etkisi incelenmemiştir (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2009). Bu çalışmanın sonuçları diritromisinin böceğin ergin özellikleri üzerindeki olumsuz etkisinin oksidatif stresten kaynaklanabileceğini işaret etmektedir. Bu çalışmada % 1,0'lik diritromisin yaşama oranı ve gelişme süresini olumsuz etkilerken larvaların orta bağırsak MDA ve protein karbonil miktarı ile GST aktivitesini önemli derecede artırmıştır. Antioksidan enzimler aşırı oksidatif stres durumunda oluşan reaktif moleküllere karşı hassas olduklarından (Pigeolet et al. 1990), diritromisinin bu yüksek konsantrasyonu tarafından üretilen serbest radikaller GST enziminin aktivitesini artırmış olabilir. *Drosophila melanogaster* (Meigen)'de glutatyona bağımlı enzimlerin (GST ve GPx) aktivitelerindeki artışın ömür uzunluğunda artışa neden olduğu ve oksidatif strese direncin arttığı gözlenmiştir (Parkes et al. 1993, Sohal et al. 1995, Sun et al. 2002). Büyükgüzel (2006) organofosforlu insektisitlerin öldürücü olmayan dozlarına karşı bir tepki olarak *P. turionellae* erginlerinde SOD aktivitesinin ve ömür uzunluğunun arttığını göstermiştir. Uzun süre fenitrotiyona maruz bırakılan lepidoptera takımına ait *S. exigua*'nın erginlerinde artan SOD aktivitesi ile birlikte yaşama oranının ve ömür uzunluğunun arttığı gözlenmiştir (Adamski et al. 2003). Daha önce yapılan bu çalışmaların sonuçları ve *G. mellonella* ile yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar birlikte ele alındığında oksidatif ve antioksidatif tepki ile ilişkili olarak yaşam parametrelerindeki değişme böceğin türü ile denenen oksidan maddenin türüne ve konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmektedir.

Diritromisinin en yüksek miktarını içeren besin ile beslenen larvalardan elde edilen erginlerin erkek ve dişi oranları önemli derecede azalmıştır. Dişi birey sayısının az olması bırakılan yumurta sayısının azalması sebebiyle zararlı böceklerin tarımsal alanlarda çoğalmasının sınırlanması ve sonraki döllerde bitkilere verilecek zararın azalması anlamına gelmektedir. Gülel (1988) bazı böceklerde eşey oranının fazlasıyla değişebildiğini belirtmiştir. Eşey oranındaki bu değişimler yumurta bırakan dişiye, erkek ve dişi larvalar arasındaki ölüm farkına, dişilerdeki çiftleşme sayısı gibi genetik olmayan faktörler yanında genetik faktörlere de bağlı olarak açıklanmaktadır. Lepidoptera takımına ait türlerde kromozomal olarak genetik eşey belirlenmesinin dışında ekstrakromozomal şekilde dişi böcek tarafından yumurta aracılığıyla kalıtsal olarak nesilden nesile nakledilen *Wolbachia* cinsi bakteriler (*Wolbachia pipientis* (Hertig)) tarafından böceğin üreme şekli değiştirilmektedir. Bu türlerde *Wolbachia*'nın sitoplazmik enfeksiyonu sonucunda büyük oranda dişi birey oluşturulmaktadır. Bu mikroorganizma tarafından uyarılan aşırı dişi üretimi üç mekanizma ile gerçekleşmektedir (Kageyama et al. 1998). Mekanizmalardan birincisi, bu

mikrorganizmaların partenogenezi uyararak büyük oranda dişi birey oluşumunu sağlaması, ikincisi, erken evrelerde seçici olarak erkeklerin ölümü (male killing) ve üçüncüsü ise erkeklerin genetik olarak dışlaştırılmasıdır. Dişi böcek tarafından kalıtsal olarak dölden dölle geçirilen *Wolbachia* ile enfekte olan tamamen dişi döl meydana getiren *Ostrinia scapularis* (Walker) dişileri tetrasiklin ve diğer bazı antibiyotikler ile birkaç nesil beslendiğinde eşey oranı erkek birey lehine değişmiştir (Kageyama et al. 2003). Bu çalışma antibiyotiklerin böceklerde eşey oranı üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Diritromisinin en yüksek konsantrasyonunu içeren besinlerde *G. mellonella*'nın dişi eşey oranı aynı besindeki erkek eşey oranına göre artış göstermesine rağmen istatistiksel olarak önemli bir artış olmadığı görülmektedir. Ancak diritromisinin eşey oranı üzerindeki muhtemel etkisini ortaya çıkarmaya yönelik daha detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Diritromisinin tüm miktarlarını içeren besinlerde yetiştirilen dişilerin yumurta veriminde önemli bir azalma olmuş, denenen en yüksek diritromisin konsantrasyonunda bırakılan yumurtaların büyük bir çoğunluğunun embriyonik gelişimi tamamlayamadığı ve normal olarak açılmadığı görülmüştür. Ekonomik olarak zarara sebep olan böceklerin yumurta sayısının azalması ve bu yumurtaların canlılık oranının düşük olması böceklerin kontrolünde önemlidir. Bazı çalışmalar çeşitli antibiyotiklerin bazı takımlara ait böceklerin yumurta üretimini çoğunlukla olumsuz yönde etkilediğini ortaya çıkarmıştır (Giordano et al. 2010). Örneğin toprakta bulunan *Folsomia fimetaria* L. ve *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta: Enchytraeidae)'nın ergin yaşama oranı ve verdikleri yeni nesil birey sayısının üzerine oksitetrasiklin ve tilozin antibiyotikleri düşük bir toksik etki yapmıştır. Oksitetrasiklin yaşama oranını etkilemezken tilozin önemli olmayan bir azalmaya sebep olmuştur. Buna karşılık oksitetrasiklin bu iki böceğin üreme oranını önemli derecede düşürmüştür (Bagger et al. 2000). Bazı antimikrobiyal maddelerden metronidazol, olanquindoks, tiamulin ve antihelmintik ivermektinin *Folsomia fimetaria*'nın üreme oranını düşürmüştür (Jensen et al. 2003). Diritromisinin etkisinin denendiği *G. mellonella* ile yaptığımız bu çalışma antibiyotiklerin böceklerdeki etkisinin belirlenmesinde ergin ömür uzunluğuna göre yaşama oranı ve üreme ile ilgili özelliklerin daha hassas kriterler olduğunu göstermiştir. Diğer çalışmalar ile bu durum desteklenmektedir. Örneğin, rifampisin *F. candida* Willem'nin yumurta sayısını etkilemezken yumurtaların açılma oranını düşürmüştür (Timmermans and Ellers 2008). Buna karşılık Pike and Kingcombe (2009) rifampisinin yumurta sayısında ve açılma oranında bir azalmaya sebep olduğu ancak tetrasiklinin yumurta sayısını düşürmediğini belirtmiştir. Kimyasal mücadelede kullanılan bazı antiviral maddelerin heteropter böceklerden *Pyrrhocoris*

apterus (Linnaeus)'da ve *Dysdercus cingulatus* (Fabr.)'da ovaryum ve folikül hücrelerinin yapısının bozulmasına, embriyo gelişimi için önemli olan vitellin proteininin sentezinin önlenmesine bağlı olarak embriyonik gelişimin gerilemesine sebep olmuştur (Sláma et al. 1983, Šula et al. 1987, Socha et al. 1988, Gelbič and Holy 1985). Antiviral özelliğe sahip bazı nükleozit türevi maddeler çeşitli böceklerde ovaryumlardaki yumurta verimini juvenil hormon (JH) titresini değiştirmek suretiyle etkilemektedir (Šula et al. 1987). JH ve ovaryum ekdisteroidleri yumurta hücresinin büyümesini, vitellus sentezi ve oluşumu, embriyo gelişimini düzenlemektedir (Gäde and Hoffmann 2005). Diğer taraftan, bazı antiviral özelliğe sahip nükleozit türevi sentetik insektisitler *P. apterus*'da hemolenf, yağ doku ve ovaryumdaki protein içeriğinde önemli değişikliğe sebep olmuş, yumurta oluşumunu tamamen önlemiştir (Gelbič and Šula 1990). Bu çalışmada denenen diritromisinin besinsel karışımları *G. mellonella*'da bu hormonların işlevinde önemli değişikliklere sebep olabilir.

Birçok böcekte yumurta bırakma davranışının başlaması için ovaryumun gelişimi, yumurta üretimi ve olgunlaşmasına ihtiyaç duyulur. Ovaryumların gelişmesi ve yumurta hücrelerinin büyümesi vitellin proteininin sentezi sayesinde olup bunların hepsi hormonal kontrol altındadır (Zeng et al. 2000, Engelman 1979). Diğer taraftan yumurta bırakma davranışı çevresel sinir sisteminden daha çok merkezi sinir sistemi tarafından yönetilen ve hormonal seviyede gerçekleştirilen karmaşık bir aktivitedir (Loher 1984). Bu yüzden *G. mellonella*'ya besinle verilen diritromisinin metabolizması sonucu oluşan eritromisilamin ve diğer ara ürünlerinin doğrudan hemolenfe karışarak kısa bir süre içinde yumurta üretimi, olgunlaşması, bırakımı ve bu yumurtaların açılması gibi fizyolojik davranışları olumsuz yönde etkilemesi beklenen durumdur.

Daha önceki çalışmalar herhangi bir besinsel değeri olmayan antibiyotiklerin öldürücü olmayan (subletal) etkilerinin bu maddenin besinsel bileşenler ile etkileşimine dayanarak larvaların besin tüketim oranını değiştirmesine bağlı olduğunu belirtmiştir (Büyükgüzel and İçen 2004, Büyükgüzel and Kalender 2007). Bir antibiyotik olan novobiyosinin yüksek miktarları ile beslenen endoparasitoid bir hymenopter tür *P. turionellae* larvalarının yaşama ve gelişimi de olumsuz yönde etkilenirken bu maddenin denenen en düşük miktarı böceğin yaşama oranını önemli derecede artırmıştır (Büyükgüzel 2001). Singh ve House (1970a,b) besindeki antimikrobiyal maddelerin meydana getirdiği koku ve tat değişikliğinin larvaların besin alma işlevinde etkili olduğunu belirtmiştir. Diritromisin ile beslenen *G. mellonella* dişilerinin yumurta sayısının düşmesi larval evrede antibiyotiğe bağlı olarak besin alımının

azalması sonucu olabilir. Benzer bir görüş *F. candida*'da oksitetrasiklinin vücut büyüklüğü ve yumurta sayısı üzerine olan olumsuz etkisi için ileri sürülmüştür (Giordano et al. 2010). Oksitetrasiklin içeren besinin bulunduğu kaptaki besinin azalmadığı gözlenmiştir. Ancak aynı çalışmada tilosin ve ampisilin içeren besinin sabit bir şekilde tüketildiği ve böcek üreme periyodunda iken besinin tamamen tüketildiği görülmüştür. Tully and Ferriere (2008) açlık stresinin bazı böceklerde yumurta sayısını düşürdüğü fakat üretilen bazı yumurtaların canlılığını ve açılma oranını etkilemediği göstermiştir. Bizim çalışmada diritromisinin yumurta sayısı üzerindeki toksik etkisinde, antibiyotik tarafından oluşturulan enerji (kalori) sınırlamasının olabileceğini ihmal etmemek gerekir. Bazı antibiyotiklere (örneğin tetrasiklin) uzun dönem maruz kalan *Drosophila simulans* Sturtevant'da mitokondri sayısının azaldığı ve bu etkinin iki nesil boyunca görüldüğü bilinmektedir (Ballard and Melvin 2007). Larval besinle alınan diritromisinin ergin dişilerin yumurta verimi ve açılma oranı üzerindeki olumsuz etkisi yumurta üretimi ile ilgili organlarda ve üretilen yumurtalardaki embriyonal gelişim sırasında oksidatif hasarın artması sonucu olabilir. Bu görüşün aydınlatılabilmesi amacıyla ilave deneylere ihtiyaç bulunmaktadır. Ancak, bazı omurgalı türlerinde yumurta açılımının oksidatif stresin artışı ile ters orantılı olduğu bilinmektedir (Alonso-Álvarez et al. 2010).

Antibiyotiklerin böceklerin orta bağırsak dokusunda protein oksidasyonu düzeyine etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Proteinler serbest radikal saldırılarına doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlı olduğundan bu biyomoleküldeki hasar lipidlerdeki hasara göre toksisitenin şiddeti hakkında daha kesin bilgi vermektedir. Besine çeşitli amaçlarla ilave edilen antibiyotiklerin böcek üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi için belirli evrelerdeki bireylerin dokularında biyokimyasal analizlerinin yapılması ve fizyolojik değişimlerin ortaya konulması önemli kriterlerdir (Eid et al. 1989, Büyükgüzel and İçen 2004, Büyükgüzel and Kalender, 2008). Bu çalışmada kullanılan diritromisinin besine ilave edilen miktarları genel olarak larvaların orta bağırsağının lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeyi ile GST aktivitesini artırmıştır. Aynı zamanda besin kalitesinin düşük olması böceklerde birçok fizyolojik ve davranışsal değişime sebep olur (Slansky and Scriber 1985). Çeşitli toksinlere maruz kalarak besinsel değeri azalmış doğal besin ile beslenen predatör bir örümcek türü *Pardosa prativaga* (L. Koch)'da GST enziminin aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur (Nielsen and Toft 2002). Böceklerin serbest radikallerden ve genel oksidatif stresten etkilendiği bilinmektedir (Timmermann et al. 1999). Böcekleri yetiştirmek için kullanılan yapay besinlerin besin bileşenleri kendi aralarında ve besine ilave edilen madde ile etkileşerek

reaktif oksijen türevlerinin (ROT) oluşmasına sebep olurlar. Besinlerde oluşan serbest radikaller toksitenin artmasına bağlı olarak larvaların besin tüketim oranını değiştirmektedir (Cohen and Crittenden 2004). Bunun sonucunda besin kalitesinin değişimine bağlı oluşan dış kaynaklı serbest radikaller ile sindirim sırasında oluşan iç kaynaklı serbest radikaller sindirim dokularındaki yapısal ve işlevsel proteinleri hasara uğratabilmektedir.

Canlıların kimyasal maddeler veya çevre kirliliğine neden olan maddeler gibi çeşitli yabancı maddelerin etkileri altında kalmaları, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna ve dolayısıyla metabolik olayların bozulmasına neden olur. Serbest oksijen radikalleri sahip oldukları paylaşılmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif atom ve moleküllerdir. Bu radikaller hücre zarının doymamış yağ asitleri ve protein bileşimi üzerine zarar vermektedir. (Halliwell 1994, Heinle and Betz 1994). Serbest radikallerin zar ile etkileştiği durumda enzimler, hormonlar ve nörotransmitter maddeler olumsuz yönde etkilenmektedir. Patofizyolojik durumlarda üretilen serbest oksijen radikalleri ve organik hidroperoksitleri detoksifikasyon ve antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılır. Ayrıca oluşan serbest radikaller sonucu hücre zarının ve diğer hücrel lipit ve proteinlerin yapısının bozulmasıyla lipit peroksidasyonu olarak tanımlanan bir dizi reaksiyon gerçekleşir ve sonuçta aldehit türevleri, özellikle MDA ile protein karbonil ürünleri, oluşur. MDA miktarının yükselmesi lipit peroksidasyonu seviyesinin önemli bir göstergesidir (Mano et al. 1995). Çeşitli antibiyotiklerin *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında lipit hidroperoksit miktarını artırdığı ve oksidan strese sebep olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur (Büyüküzümlü and Kalender 2007, 2009).

Böceklerde kimyasal maddelerin toksik etkisini azaltıcı ve hatta yok edici direnç mekanizmaları gelişmiştir. Oksidatif strese karşı dirençte etkili olduğu bilinen önemli enzim grubu GST'dir (Parkes et al. 1993, Yu 1993, 2004, Sivori et al. 1997, Wei 2001). Böceklerde bu enzim ailesi (teta sınıfı) insektisitlerin toksik etkilerine karşı savunma ve direnç geliştirme amaçlı iş görmektedir (Clark et al. 1985, Singh et al. 2001). GST bir faz II detoksifikasyon enzimi olup ksenobiyotikleri glutatyon (GSH; γ -glutamil-sisteinil-glisin) bağlayarak toksitesini azaltır. Diğer taraftan GST hücre içi iyon kanallarının düzenlenmesi ve madde taşınması, prostaglandin biyosentezi gibi çeşitli biyosentez yollarında da rol oynamaktadır (Wilce and Parker 1994). *M. domestica*'da organofosforlu insektisitlere dirençli mutantların yüksek seviyede GST aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Çakır ve Yamanel 2005). Ancak bu sonuçlar ile uyumlu olarak dinitromisini yüksek miktarlarda içeren besinler ile

beslenen *G. mellonella* larvalarının orta bağırsak GST aktivitesi önemli derecede artmıştır. GST aktivitesinin artması diritromisin tarafından oluşturulan ROT'ların sebep olduğu lipid peroksidasyonu ürünü MDA'nın ve protein karbonilin detoksifikasyonu amacıyla olabilir. Bu nedenle GST enzimi artan ROT ve diğer organik hidroperoksitler ile protein karbonillerin zararlı etkilerini ortadan kaldırabilir (Halliwell and Gutteridge 1999). Besinsel kalitesi düşük olan doğal besinlerle beslenen bir lepidopter tür *L. dispar*'ın orta bağırsağında antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı ve bu enzim aktivitesindeki artışın farklı larval evrelere bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir (Peric-Mataruga et al. 1997). Benzer sonuçlar farklı prooksidanlara maruz kalan *M. domestica*, *T. ni*, *Spodotera eridania* (Stoll) gibi çeşitli böcek türlerinin farklı gelişme evrelerinde de gözlenmiştir (Ahmad and Pardini 1990, Zaman et al. 1994, Ahmad et al. 1995). Lepidoptera takımına ait böceklerin larvaları çeşitli oksidan maddelerle beslendiği zaman orta bağırsaklarında peroksit radikalleri başta olmak üzere çeşitli ROT'lar oluşmaktadır. Bu peroksitler ya besinle alınan veya besin kanalında daha önceden bulunan demir gibi çeşitli aktif metal iyonları ile etkileşerek (Fenton reaksiyonu) hidroksil radikali (OH⁻) ve diğer ROT'ları oluşturabilir (Barbehenn et al. 2005). Bu reaktif türevler orta bağırsak epitel dokusunda ve peritrofik zarda protein ve lipid oksidasyonuna bağlı oksidatif hasar meydana getirmektedir (Barbehenn and Stannard 2004). Büyükgüzel ve Kalender (2007, 2009) tarafından penisilin ve streptomisin'in *G. mellonella* üzerindeki etkisi için ileri sürüldüğü gibi bu çalışmada diritromisinin toksitesi sonucunda serbest radikal oluşumunun artışı ile ortabağırsak GST enziminin aktivitesi artmış olabilir.

Antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerin aktivitelerinin genellikle türe, gelişme evresine ve dokuya özgü olarak değiştiği gözlenmiştir (Ahmad and Pardini 1990, Ahmad et al. 1995). Bu çalışmada son evre larvalarının orta bağırsağı dışında diğer evreler ile larva sonrası evrelerdeki bireylerin orta bağırsak enzim aktivitelerinin değişimleri incelenmemiştir. Ancak denenen diritromisin konsantrasyonlarının böceğin ergin evreye kadar yaşama oranı, gelişme süresi, ergin eşey oranı ve ömür uzunluğu üzerine etkilerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar böceğin orta bağırsak detoksifikasyon kapasitesinin evrelere göre değişebileceğini işaret etmektedir. Pro-oksidan madde kaynağı bazı bitkisel besinler ile beslenen *L. dispar* larvalarının farklı evrelerindeki orta bağırsak dokusunda antioksidan enzim aktivitelerinin farklı olduğu bilinmektedir (Perić-Mataruga et al. 1997). Çeşitli insektisitlere maruz kalmış pamuk kurdu *H. armigera*'daki detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinin larval ve ergin evreye göre değiştiği gösterilmiştir (Leonova and Slynko 1996). Bu yüzden diritromisin ile ilişkili olarak böceğin diğer evrelerindeki oksidatif stres düzeyi ve bu düzeydeki değişimlere

bağlı olarak antioksidan savunma ve detoksifikasyon kapasitesinin değişimlerin belirlenmesi amacıyla detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Diritromisinin besindeki miktarlarının artışı ile böcek üzerindeki etkisi arasında genellikle orantılı bir ilişki ortaya çıkmıştır. Örneğin diritromisinin besindeki miktarı arttıkça yaşama oranı ve yumurta verimi azalmıştır. Diğer taraftan, diritromisinin düşük besinsel konsantrasyonlarında böceğin gelişme süresi, eşey oranı ve dişilerin bıraktığı yumurtaların açılma oranı önemli derecede etkilenmemiştir. Hormetik etki denilen bu mekanizma insektisitlerin düşük miktarlarına karşı tolerans geliştirme yönünde bir adaptasyon tepkisidir. Benzer etki bir parazitoid böcek *P. turionellae*'nin Laboratuvar şartlarında yapay besinler ile yetiştirilmesi sırasında çeşitli antibiyotikler tarafından da ortaya çıkarılmıştır (Büyükgüzel 2001, 2002). Bu çeşit etkilerin böceklerde prooksidan ve antioksidan sistem ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (Büyükgüzel 2006). Benzer şekilde, Lepidoptera takımına ait bir tür olan *L. dispar*'nin besinine ilave edilen fenolik bir glikozitin düşük miktarları böceğin GST ve esteraz enzimlerinin aktivitesini artırmıştır (Hemming and Lindroth 2000). Bu sonuçlar diritromisin ile *G. mellonella*'da yaptığımız bu çalışmanın sonuçları ile uygunluk göstermektedir. Lepidoptera takımına ait böceklerde besin maddelerinin sindirimi genellikle alkali bir ortama sahip olan orta bağırsakta gerçekleştirilmektedir (Terra 1990). Böylece bu çalışmada besinle alınan farklı konsantrasyonlardaki diritromisinin *G. mellonella*'nın orta bağırsağında ozmotik dengeyi ve ortamın reaksiyonunu (pH) etkilemesi sonucu farklı oranlarda emilimi gerçekleştirebilir. Daha önceki bir çalışmada Büyükgüzel ve Yazgan (1996) tarafından farklı etki mekanizması ve yapıya sahip antibiyotikler içeren besinler ile beslenen parazitoid böcek *P. turionellae* için ileri sürüldüğü gibi bu çalışmada denenen diritromisin konsantrasyonları böceğin bağırsağının fiziksel ve kimyasal yapısını değiştirerek sindirim fizyolojisini etkilemiş olabilir. Bu görüş ile uyumlu olarak Büyükgüzel ve Kalender (2007, 2009) penisillin ve streptomisin *G. mellonella*'nın orta bağırsağında karbohidrat ve protein metabolizması ile ilgili transaminazlar ALT ve AST enzimlerinin aktivitelerini önemli derecede düşürdüğünü göstermiştir. Diğer taraftan *G. mellonella* larvalarının bağırsağından emilerek dokulara ulaşan diritromisinin ve metabolizma ürünlerinin (eritromisilamin) olumsuz etkisi detoksifikasyon ile ortadan kaldırılabılır. Benzer bir düşünce Graf ve Benz (1970)'in bazı sentetik antibiyotiklerin *D. melanogaster*'in yaşama ve gelişimi üzerine etkisini incelediği çalışmada da ileri sürülmüştür. Böceklerde önemli detoksifikasyon enzimi sitokrom P450 monooksijenaz insektisit metabolizmasında önemli role sahiptir (Scharf et al. 1999). Doğada böcekler yaşamları sırasında rastgele ya da rutin olarak aktinomiset ve streptomises türü bakteriler ve

diğer mikroorganizmalar (fungus) tarafından doğal olarak üretilen antibiyotikler ile karşılaşabilirler. Diritromisin *G. mellonella* erkek ve dişi ömür uzunluğunu etkilememiştir. Diğer taraftan diritromisin düşük konsantrasyonlarda yaşama oranı, eşey oranı ve yumurtaların açılma oranı üzerinde etkili olmamıştır. Bu etki Giordano et al (2010) tarafından *F. candida*'da yüksek dozlardaki antibiyotiklerin düşük toksisitesi için ileri sürdüğü gibi *G. mellonella*'nın uzun sürede zamana bağlı olarak antibiyotiği ve metabolizma ürünlerini detoksifiye etmesi sonucu ortaya çıkabilir. Bu çalışmada diritromisin ile beslenen larvaların orta bağırsak GST aktivitesinin yüksek bulunması bu görüşü desteklemektedir. Diritromisinin de dahil olduğu makrolid grubu antibiyotiklerin omurgalılarda dokulardan eliminasyon süresi uzun olup P-450 enzimi tarafından metabolize edilmediği bilinmektedir (Kirst et al. 1995). Bu durum böceklerde de geçerli ise bir detoksifikasyon ve biyotransformasyon enzimi olarak GST aktivitesinin yüksek bulunması beklenen bir durumdur. Ancak bu durumu detaylı açıklamak için *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında P-450 ve diğer esteraz enzimlerinin aktivitelerinin de çalışılması gereklidir. Liu ve Chen (2000) bir kitin sentezi inhibitörü olan buprofezinin nöropter bir tür olan *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) (Burmeister)'in larval evresindeki olumsuz etkisinin çok az olmasını böceğin detoksifikasyon kapasitesinin yüksek olmasına bağlamıştır.

BÖLÜM 5

SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre diritromisinin son evre larvalarının orta bağırsağında sebep olduğu oksidatif strese bağlı olarak oluşan biyomoleküler hasar sonucu böceğin biyolojik özellikleri üzerinde olumsuz etki gösterebileceği anlaşılmaktadır. Bu çalışmada böceğin ergin evresinde diritromisinin oksidatif etkisine bakılmamasına rağmen bu antibiyotiğin sebep olduğu oksidatif hasardan böceğin ergin özelliklerinin olumsuz yönde etkilendiğini söyleyebiliriz. Diritromisinin denenen en yüksek konsantrasyonunda GST enziminin aktivitesindeki önemli artış, MDA ve protein karbonil miktarlarındaki yükselme ile birlikte yaşama oranının düşmesi, gelişme süresinin uzaması, eşey oranının, yumurta verimi ve açılma oranının azalması bu düşüncüyü destekleyen önemli sonuçlardır. Diritromisinin düşük konsantrasyonlarında meydana gelen MDA ve protein karbonil miktarlarındaki önemli artış ile birlikte GST aktivitesinin önemli düzeyde etkilenmemesi, larvaların oksidatif strese başlangıçta bir adaptasyon davranışı göstermesi sonucu olabilir. Diritromisinin böceğin biyolojik yaşam özellikleri ile fizyolojisi ve biyokimyası üzerinde gösterdiği toksik etki mekanizmasının tüm yönleriyle anlaşılması zararlı böceklerle mücadelede, hedef olmayan canlılara ve çevreye daha az olumsuz etkisi olan yeni kimyasal yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar antibiyotiklerin böceğin larva, pup ve ergin evresindeki yaşama oranı, bu evrelere gelişme süreleri (Büyükgüzel 2001, 2002, Büyükgüzel ve Kalender 2008) ile son evre larvalarının orta bağırsak dokusundaki lipid peroksidasyonu düzeyi ve enzimatik antioksidan savunma üzerine olumsuz etkileri (Büyükgüzel ve Kalender 2007, 2009) yanında böceğin eşey oranı, erkek ve dişi ömür uzunluğu, yumurta sayısı ve açılma oranı ile orta bağırsak protein oksidasyonu düzeyini de etkilediğini göstermiştir. Bu sonuçlar düşük miktardaki anibiyotik ile çevreye ve hedef olmayan canlılara zarar vermeden hedef böcek ile mücadele bakımından önemlidir. Bu çalışmadan elde edilen en önemli sonuç zararlı böcekler ile mücadelede çevre ve hedef olmayan canlılara şu anda kullanımda olan insektisitler kadar zararlı olmayan antibiyotiklerin kullanımına yönelik bir stratejiye öncülük edilmiş olmasıdır. Bu konuda farklı etki

mekanizmasına ve kimyasal yapıya sahip antibiyotikler ve daha geniş bir böcek grubu ile detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdrashitosa N F and Ramanov Y A** (2001) Effects of antibiotics on reactive oxygen species generation by neutrophils. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 132: 1163-1165.
- Adamski Z, Emnicki Z K, Fila K, Zikic R V and Stajn A** (2003) Effects of long-term exposure to fenitrothion on *Spodoptera exigua* and *Tenebrio molitor* larval development and antioxidant enzyme activity. *Biological Letters*, 40(1): 43-52.
- Ahmad S** (1992) Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemistry Systems Ecology*, 20: 269-296.
- Ahmad S** (1995) Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of Insect Biochemistry*, 29: 135-157.
- Ahmad S and Pardini R S** (1990a) Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology & Medicine*, 8: 401-413.
- Ahmad S and Pardini R S** (1990b) Antioxidant defense of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*: Enzymatic responses to the superoxide-generating flavonoid, quercetin, and photodynamic furocoumarin, xanthotoxin. *Photochemistry Photobiology*, 51: 305-311.
- Ahmad S, Duval D L, Weinhold L C and Pardini R S** (1991) Cabbage looper antioxidant enzymes: Tissue Specificity. *Insect Biochemistry*, 21: 563-572.
- Ahmad S, Beilsen M A and 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.
- 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*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 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*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29: 442-448.
- 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.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 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.
- Appel A G, Gehret M J and Tanley M J** (2004) Effects of moisture on the toxicity of inorganic and organic insecticidal dust formulations to German cockroaches (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 97: 1009-1016.
- Ansari K A, Kaplan E and Shoeman D** (1989) Age Related Changes in Lipid Peroxidation and Protective Enzymes in The Central Nervous System. *Growth Develop. Aging*, 53 (3): 117-21.
- Arking R, Burde V, Graves K, Hari R, Feldman E, Zeevi A, Soliman S, Saraiya A, Buck S, Vettraino J, Sathrasala K, Wehr N and Levine R L** (2000) Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns. *Experimental Gerontology*, 35: 167- 185.
- 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. *Archives of Insect Biochemistry Physiology*, 16: 139-152.
- Aydin K** (2007) Makrolidler ve linkozamidler. *Ankem Dergisi*, 21 (2): 57-61.
- 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.
- 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.
- 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.
- Barbehenn R V, Jaros A, Yipp L, Tran L, Kanellis A K and Constabel C P** (2008) Evaluating ascorbate oxidase as a plant defense against leaf-chewing insects using transgenic poplars. *Journal of Chemical Ecology*, 34 (10): 1331- 1340.
- Barbehenn R V, Jones C P, Hagerman A E and Karonen M and Salminen J P** (2006) Ellagitannins have greater oxidative activities than condensed tannins and galloyl glucoses at high pH: potential impact on caterpillars. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 2253–2267.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Barbehenn R V, Poopat U and Spencer B** (2003) Semiquinone and ascorbyl radicals in the gut fluids of caterpillars measured with EPR spectrometry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 125-130.
- Bokov A, Chaudhuri A and Richardson A** (2004) The Role of Oxidative Damage and Stress in Aging. *Mechanics Ageing Development*, 125: 811-826.
- Bi J L and Felton G W** (1995) Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.*, 21:1511-826.
- Bourdon E, Loreau N and Blache D** (1999) Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13: 233-244.
- Brogden R N and Peters D H** (1994) Dirithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 48 (4): 599-616.
- 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.
- Brown R P, McDonnell C M, Berenbaum M R and Schuler M A** (2005) Regulation of an insect cytochrome P450 monooxygenase gene (CYP6B1) by aryl hydrocarbon and xanthotoxin response cascade. *Gene*, 26: 39-52.
- 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*, 43-1.
- 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 E, Tunaz H, Stanley D W and Büyükgüzel K** (2007) Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *Journal of Insect Physiology*, 53: 99-105.
- 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** (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.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Büyükgüzel K** (2002) 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** (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** (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** (2006) Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: Effect on adult emergence, longevity, fecundity, oxidative and antioxidative response of the *Pimpla turionellae*. *Journal of Economic Entomology*, 99: 1225-1234.
- 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. *Journal of Entomological Science*, 39 (1): 108-116.
- Büyükgüzel K ve 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.
- 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 ve Yazgan Ş** (1996) Bazı antibiyotiklerin endoparazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nın yaşama ve gelişimine etkileri. *Turkish Journal of Zoology*, 20: 1-7.
- Byars J A and Wood D L** (1981) Antibiotic-induced inhibition of pheromone synthesis in a bark beetle. *Science*, 231: 763-764.
- Campos F, Donskov N, Arnason J T, Philogene B J R, Atkinson P M and Werstuik 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.
- Campos F, Donskov N, Arnason J T, Philogene B J R, Atkinson P M and Werstuik 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.
- Chamberlain W F and Schol P J** (1991) New procedures to enhance survival of third instar *Hypoderma lineatum* (Villers) (Diptera: Oestridae) in artificial media. *Journal of Medical Entomology*, 82: 266-269.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Chang C O and Hsieh F K** (1992) Morphology and bionomics of *Galleria mellonella* L. *Chinese Journal of Entomology*, 12: 121-129.
- Chang C L, Albrecht C, El-Shall S S A and Kurashima R** (2001) Adult Reproductive capacity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) on a chemically defined diet. *Annals of the Entomological Society of America*, 94: 702-706.
- 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.
- 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.
- Chen M-S** (2008) Inducible direct plant defence against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15 (2): 101-114.
- Chesemann K H and Slater T F** (1993) An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49: 481-493.
- 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.
- Clavaron-Mathews M, Summers C B and Felton G W** (1997) Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34: 57-68
- Cohen A C and Crittenden P** (2004) Deliberately added and cryptic antioxidants in three artificial diets for insects. *Journal of Economic Entomology*, 97: 265- 272.
- 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.
- Çakır Ş ve Yamanel Ş** (2005) Böceklerde insektisitlere direnç. *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 1: 21-29.
- Dean, R T, Fu S, Stocker R and Davies M J** (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Journal of Biochemistry*, 324: 1-18
- Djordjevic V B** (2004) Free radicals in cell biology. *Internal Review of Cytology*, 237: 57-89.
- Downer R G H** (1985) Lipid metabolism. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, eds. Kerkut G A and Gilbert L I, Pergamon Press, Oxford, pp. 77-113.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 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). *Comparative Biochemistry and Physiology C- Pharmacology Toxikology Endocrinology*, 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*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 41: 18-22.
- Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G and Board P** (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *Biological Chemistry*, 276: 3319-3323.
- Eid M A A, El-Nakkadi A N and Saleh M A** (1989) Functional adaptation of silk glands after administration of antibiotic to larvae of *Philosamaia ricini* (Boisd). *Insect Science and Its Application*, 10: 139-143.
- Eischen F and Dietz A** (1987) Growth and survival of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larva fed diets containing honey bee-collected plant resins. *Annals of the Entomological Society of America*, 80: 74-77.
- Engelman F** (1979) Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. *Advances Insect Physiology*, 27: 49-108.
- Evans P, Lyras L and Halliwell B** (1999) Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymology*, 300: 145-156.
- Felton G W and Summers C B** (1995) Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29: 187-197.
- Gäde G and Hoffmann K H** (2005) Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiological Entomology*, 30: 103-121.
- 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 Entomologica Bohemoslovaca*, 82: 22-27.
- Gelbic I and Sula J** (1990) Ovicidal and biochemical effects of hempa and a nucleoside analogue on *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Het., Pyrrhocoridae). *Journal of Applied Entomology – Zeitschrift Fur Angevandte Entomologie*, 109: 401-409.
- Giordano R, Weber E, Waite J, Bencivenga N, 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)

- 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 hemoleymph of *Galleria mellonella* larvae. *Russian Entomological Journal*, 12: 103-108.
- Graf E and Benz G** (1970) Toxicity of streptomycin and terramycin, and influence on growth and developmental time of *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 26: 1339-1341.
- Grenier S and Liu W H** (1990) Antifungals: Mold control and safe levels in artificial Media for *Trichogramma* (Hymenoptera:Trichogrammatidae). *Entomophaga*, 35: 283-291.
- Grenier S, Delobel B, and Bannot G** (1986) Physiological considerations of importance to the success of *in vitro* culture: an overview. *Journal of Insect Physiology*, 32: 403-408.
- 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.
- Guedes R N C, Oliveira E E, Guedes N M P, Ribeiro B and Serrao J E** (2006) Cost and Mitigation of Insecticide Resistance in the Maize Weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology*, 31: 30-38.
- Günel A** (1988) Çiftleşmenin *Dibrachys boarmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae) erkeklerinin hayat süresine ve eşey oranına etkileri. *Doğa Zooloji Dergisi*, 12 (3): 225-2230.
- Habig W H, Pabst M J and Jakoby W B** (1974) Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Hahn D A and Wheeler D E** (2003) Presence of a single abundant storage hexamerin in larvae and adults of the Grasshopper, *Schistocerca Americana*. *Journal Insect Physiology*, 49: 1189-1197.
- 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 Press, Inc., New York, USA, Third edition, 936 pp.
- Hamimy W, Ashour E and Afify M** (2004) Effect of regional epidural ropivacaine anesthesia on glutathione S-transferase: Comparison with low flow sevoflurane and total intravenous propofol anesthesia. *Journal of Biological Sciences*, 4: 398-404.
- Harak M, Lamprecht I, Kuusik A, Hiiesaar K, Metspalu L and Tartes U** (1999) Calorimetric investigations of insect metabolism and development under the influence of a toxic plant extract. *Thermochimica Acta*, 333: 39-48.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Heinle H and Betz E** (1994) Effects of dietary garlic supplementatation in rat model of atherosclerosis. *Arznei-for*, 44: 614-617.
- Hemming J D C and Lindroth R** (2000) Effects of phenolic glycosides and protein on Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and Forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) performance and detoxication activities. *Environmental Entomology*, 2: 1108-1115.
- Hermes-Lima M, Storey J M and Storey K B** (1998) Antioksidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120: 437-448.
- Hirose E, Panizzi A E and Cattelan A J** (2006) Potential use of antibiotic to improve performance of laboratory-reared *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 35: 279-281.
- Holmes E A and Keeley L L** (1975) Metabolic inhibitors: Effects on metamorphosis and flight muscle mithochondrial development in the moth, *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 5: 349-355.
- Hu ML** (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*, 233;381-385. .
- Inglis G D and Cohen A C** (2004) Influence of antimicrobial agents on the spoilage of a meat-based entomophage diet. *Journal of Economic Entomology*, 97: 235-250.
- 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** (2003) Effects of antiviral agent, acyclovir on growth, survival and development of greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Master 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. *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** (1979) Yeastlike fungi from greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*) fed antibiotics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 34: 257-262.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Jarosz J** (1989) Simplified technique for preparing germ-free specimens of greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Journal of Economic Entomology*, 82: 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.
- Kageyama D, Hoshizaki S and Ishikawa Y** (1998) Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: Evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity*, 81: 311-316.
- Kageyama D, Nishimura G, Hoshizaki S and Ishikawa Y** (2003) Two kinds of sex ratio distorters in a moth. *Ostrinia scapularis*. *Genome*, 46: 974-982.
- Kanaoka Y, Fujimori K, Kikuno R, Sakaguchi Y, Urade Y and Hayaishi O** (2000) Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase: conservation of the ancestral genomic structure of sigma-class glutathione S-transferase. *European Journal of Biochemistry*, 267: 3315-3322.
- Keeley L L and Olson J K** (1977) Toxic effects of mitochondrial DNA inhibitors on insect growth and development. *Journal of Insect Physiology*, 23: 303-307.
- Kılınçer N** (1976) *Dibrachys cavus* (Walk.) (Hymenoptera – Pteromalidae), *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera–Braconidae) ve *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera- Galleridae) Arasındaki Bazı Biyolojik ve Fizyolojik İlişkiler Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik tezi, Ankara.
- Kirst H A, Creemer L C, Paschal J W, Preston D A, Alborn W E, J R, Counter F J, Amos J G, Clemens R L, Sullivan K A and Greene J M** (1995) Antimicrobial characterization and interrelationships of dirithromycin and epidirithomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (7): 1436-1441.
- 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 Sehna 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, Turanlı F and Sehna F** (2007) Stage- specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology*, 53: 67-74.
- Krishnan N, Kodrik D, Kludkiewicz and Sehna F** (2009) Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39 (3): 180-188.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Laing D R and Hagen K S A** (1970) Xenic, partially synthetic diet for the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Canadian Journal of Entomology*, 102: 250-252.
- Lee K and Berenbaum M R** (1990) Defense of parsnip webworm against phototoxic furanocoumarins: role of antioxidant enzymes. *Journal of Chemical Ecology*, 16: 2451-2460.
- Leonova I N and Slynko N M** (1996) Comparative study of insecticide susceptibility and activities of detoxification enzymes in larvae and adults of cotton bollworm, *Heliothis armigera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32: 157-172
- 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.
- 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.
- Liu T X and Chen T Y** (2000) Effects of the chitin synthesis inhibitor buprofezin on survival and development of immatures of *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Economic Entomology*, 93 (2): 234-239.
- Loher W, Clark W H, Jr. Fischer A, Olive P J W and Nent D F** (1984) Behavioral and physiological changes in cricket-females after mating. *Adv. In Invertebrate Reproduction*, eds. Engles, Elsevier, Amsterdam, pp.189-201.
- 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.
- 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. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 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. *Journal of Endocrinology*, 145: 131-136.
- Mathews M C, Summers C B and Felton G W** (1997) Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34:57-68.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- McConnell S A, Nafziger A N and Amsden G W** (1999) Lack of effect of dirithromicin on theophylline pharmacokinetics in healthy volunteers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43: 733-736.
- 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. *Biological Chemistry*, 384 (3): 463-472.
- Mittler T E** (1971) Some effects on the aphid *Myzus persicae* of ingesting antibiotics incorporated into artificial diets (Hom. Aphididae). *Journal of Insect Physiology*, 17: 1333-1347.
- Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S and Niwa Y** (1986) Effects of antibiotics on generation of reactive oxygen species. *Journal of Investigative Dermatology*, 9: 449-453.
- Müller O and Wettich K** (1993) Clinical efficacy of dirithromycin in pharyngitis and tonsillitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 31, 97-102.
- Nath B S, Suresh A, Varma B M and Kumar R P S** (1977) Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 6: 169-173.
- 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 Press, Aarhus, pp. 65-70.
- O'Brien M L and Tew K D** (1996) Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *European Journal of Cancer*, 32: 967-978.
- Orr G L and Downer R G H** (1982) Effect of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) on carbohydrate and lipid reserves in the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 17: 89-102.
- 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. *Journal of Economic Entomology*, 55: 854-857.
- Parenti P, Giordana B, Sacchi V F, Hanozet G M and Guerritore A** (1985) Metabolic activity related to the potassium pump in the midgut of *Bombyx mori* larvae. *Indian Journal Experimental Biology* Apr, 116: 69-78.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 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.
- Pearson B and Raybould A F** (1998) The Effects of antibiotics on the development of larvae and the possible role of bacterial load in caste determination and diapause in *Myrmica rubra* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 31: 77-90.
- Peric-Mataruga V, Blagojevic D, Spasic M B, Ivanovic J and Jankovic-Hladni M** (1997) Effect of the host 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.
- Pike N and Kingcombe R** (2009) Antibiotic treatment leads to the elimination of *Wolbachia* endosymbionts and sterility in the diplodiploid collembolan *Folsomia candida*. *BMC Biology*, 7: 54.
- C A, Ahmad S, Elliot A J, Blomquist G J and Pardini R S** (1988) Antioxidant enzymes of the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*, and their response to the prooxidant allelochemical, quercetin. *Arch. Insect. Biochem. Physiol*, 8: 101-112.
- Pritsos C A, Pastore J and Pardini R S** (1991) Role of superoxide dismutase in the protection and tolerance to the prooxidant allelochemical quercetin in *Papilio polyxenes*, *Spodoptera eridania* and *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem. Physiol*, 16 (4): 273-282.
- Punzo F** (1993) Detoxification enzymes and the effects of temperature on the toxicity of pyrethroids to the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105: 155–158.
- Reznick A Z and Packer L** (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233:357-363.
- Ridgway N M and Mahr D L** (1990) Reproduction, development, and longevity of *Pholetesor ornigis* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of spotted tentiform leafminer (Lepidoptera: Gracillaridae), in the laboratory. *Annals of the Entomological Society of America*, 83: 790-794.
- 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*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121: 159-166 .

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Scharf M E, Lee C Y, Neal J J and Bennett G W** (1999) Cytochrome P450 MA expression in insecticide-resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 92: 788-793.
- 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 A₂ activity in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 26: 385-395.
- Sestini E A, Carlson J C and Allsopp R** (1991) The effects of ambient temperature on life span, lipid peroxidation, superoxide dismutase, and phospholipase A₂ activity in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 26: 385-395.
- 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. *Journal of Biochemistry*, 360: 1-16.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 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 Entomologica Bohemoslovaca*, 85: 408- 417.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Sohal R S, Agarwal S, Sohal B H** (1995) Oxidative stress and aging in the Mongolian Gerbil. *Mechanisms of Ageing and Development*, 81: 15-25.
- Spiteller G** (2001) Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122: 617-657.
- SPSS** (1997) User's manual, version 10. SPSS, Chicago, IL.
- Stadtman E R** (1992) Protein oxidation and aging. *Science*, 257: 1220-1224.
- 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 Entomologica Bohemoslovaca*, 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.
- Suwalsky M, Ramos P, Villena F, Cardenas H, Norris B, Cuevas F and Sotomayer C P** (2001) The organophosphorus insecticide parathion changes properties of natural and model membranes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70: 74-85.
- Syvanen M, Zhou Z, Wharton J, Goldsbury C and Clark A** (1996) Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 236-240.
- Takenaka Y, Miki M, Yasuda H and Mino M** (1991) The effect of α -tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 285:344-350.
- Terra W R** (1990) Evolution of digestive systems of insects, *Annual Review of Entomology*, 35: 181-200.
- Terra W R, Ferreira C and Baker J E** (1996) Compartmentalization of Digestion In Lehane, J. and Billingsley, P. F. (Eds.). *Biology of Insect Midgut.*, MChapman and Hall, London, 206-235.
- Thayer D W** (1973) Effect of antibiotics and antimalarials on free amino acids of *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*, 10: 57-62.
- Timmerman S E, Zangerl A R and Berenbaum M R** (1999) Ascorbic and uric acid responses to xanthotoxin ingestion in a generalist and a 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.
- Tully T and Ferriere R** (2008) Reproductive flexibility: genetic variation, genetic costs and long-term evolution in a collembola. *PLoS One*, 3: 3207.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Vail P V, Hennebery T J, Kishaba A N and Arakawa K Y** (1968) Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear polyhedrosis virus in larvae of the *Cabbage looper*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 10: 84-93.
- Van Frankenhuyzen K, Liu Y and Tonon A** (2010) Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 124-131.
- 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.
- Vijayalekshmy K S, Menon V P and Leelamma S** (1992) Role of antibiotics in lipid peroxidation. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 29: 371-374.
- Wadleigh R W** (1988) Metabolism of an organothiocyanate allelochemical by glutathione transferase in three lepidopterous insects. *Journal of Economic Entomology*, 81: 776-780.
- Wei S H, Clark A G and Syvanen M** (2001) Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione-S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 1145-1153.
- Wilce M C and Parker M W** (1994) Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205: 1-18.
- Wintermeyer S M, Abdel-Rahman S M, Nahata S M and Nahata M C** (1996) Dirithromycin: a new macrolide. *Annals of Pharmacotherapy*, 30(10):1141-1149.
- 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. *Journal of Entomological Science*, 21: 133-138
- Yu S J** (1993) Induction of detoxification enzymes in phytophagous insects: roles of insecticide synergists, larval age, and species. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 24: 21-32.
- Yu S J** (1996) Insect glutathione-S-transferase, *Zoological Studies*, 35: 9-19.
- Yu S J** (2004) Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80: 113-122.
- Zalucki M P, Clarke A R and Malcolm S B** (2002) Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 47: 361-393.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Zaman K, MacGill R S, Johnson J E, Amad S and Pardini R S** (1994) An insect model for assessing mercury toxicity: effect of mercury on antioxidant enzyme activities of the housefly (*Musca domestica*) and the cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26: 114-118.
- Zeng F, Shu S, Ramaswamy S B and Srinivasan A** (2000) Vitellogenin in pupal hemolymph of *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93: 291-294.
- Zhou H A and Syvanen M** (1997) A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*, *Molecular Genetics and Genomics*, 256: 187-198.

ÖZGEÇMİŞ

Murat Hamzaoğlu 1981'de Kumru'da doğdu; ilk ve orta eğitimini Zonguldak'da tamamladı; Zonguldak İmam Hatip Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2000 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Maçka Meslek Yüksek Okulu Laboratuvar Bölümü'ne girdi; 2002'de mezun olduktan sonra, 2003 yılında Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans programına başladı. 2006 yılında Erciyes Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi'nden mezun oldu. 2007 yılında Abdiibrahim İlaç da işe başladı.Halen Tıbbı Tanıtım Temsilcisi olarak görev yapmaktadır. 2009 yılında BEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına girdi.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres: Tepabaşı Mah. 88 Evler Küme Evleri
No: 21 Daire 1
Merkez / ZONGULDAK

Tel: (533) 287 38 07

E-posta: murathamzaoglu@hotmail.com