

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

**Suzan KASTAMONULUOĞLU**

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

**ZONGULDAK**

**Aralık 2012**

**KABUL:**

Suzan KASTAMONULUOĞLU tarafından hazırlanan “TERBİNAFİNİN *GALLERIA MELLONELLA L.* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)’NİN BAZI BİYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİSİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 10/12/2012


Başkan: Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL (BEÜ)



Üye : Doç. Dr. Ayşe KAPLAN (BEÜ)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Tolga ACUN (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.”*



Suzan KASTAMONULUOĞLU

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

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

Suzan KASTAMONULUOĞLU

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL

Aralık 2012, 37 sayfa

Allilamin grubu sentetik bir antifungal antibiyotik olan terbinafin *Galleria mellonella* L. yapay besin ortamına ilave edilerek böceğin yaşama, gelişme, eşey oranı, ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu, yumurta verimi, açılma oranı gibi biyolojik özellikleri üzerine etkisi laboratuvar şartlarında incelendi. Ayrıca, böceğin son evre larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyonu ürünü malondialdehid (MDA) ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil miktarları ile detoksifikasyon enzimi glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesi üzerine etkisi incelendi. % 0,001, 0,01, 0,1 ve 1,0 oranında terbinafin içeren yapay besinle beslendi. 7. evreye ulaşan larva oranını, pup ve ergin olma oranını, terbinafinin denenen tüm konsantrasyonları önemli derecede düşürmüştür. Terbinafinin en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) ergin olma oranını %  $88,9 \pm 5,9$ 'dan %  $11,0 \pm 0,00$ 'e, erkek ve dişi eşey oranının her ikisini de %  $5,5 \pm 0,00$ 'e düşürmüştür. Bu antifungal, ergin evreye kadar gelişme süresi ile ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu üzerinde önemli bir etki yapmamıştır. Kontrol besininden elde edilen dişilerden  $82,9 \pm 18,1$  yumurta elde edilmiş olup bu sayı % 0,1'lik terbinafin

## ÖZET (devam ediyor)

konsantrasyonu tarafından  $51,4 \pm 9,6$ 'e önemli derecede düşürülmüştür. Ayrıca, terbinafinin en yüksek konsantrasyonu dişilerin yumurta bırakmasını engellemiştir. Terbinafin, 7. evre larvalarının orta bağırsak MDA miktarını ve GST aktivitesini besindeki artan konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artırmıştır. Terbinafinin en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) MDA miktarını  $0,059 \pm 0,002$  nmol/mg protein'den  $0,653 \pm 0,2$  nmol/mg proteine yaklaşık 11 katı oranında önemli derecede yükseltmiştir. Terbinafinin bu konsantrasyonu GST aktivitesini  $1,473 \pm 0,4$ 'den  $8,30 \pm 1,5$   $\mu$ mol/mg protein/dk'ya yaklaşık altı kat arttırmıştır. Kontrol besini ( $155,19 \pm 21,8$  nmol/mg protein) ile karşılaştırıldığında terbinafinin düşük besinsel konsantrasyonları (% 0,001, 0,01 ve 0,1) protein karbonil miktarını önemli derecede artırmış olup, % 0,1'lik terbinafin bu miktarı  $737,17 \pm 36,4$  nmol/mg protein'e ulaştırmıştır. Terbinafinin en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) ise protein karbonil miktarını 2 katı artırmış ( $315,12 \pm 35,6$  nmol/mg protein) ancak terbinafinin düşük konsantrasyonlarına göre protein karbonil miktarında azalma kaydedilmiştir. Bu çalışma böceğin ergin biyolojik özellikleri ile orta bağırsak oksidatif durum ve detoksifikasyon kapasitesinde terbinafin konsantrasyonlarına bağımlı değişimler olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Galleria mellonella*, terbinafin, yaşama oranı, malondialdehid, protein karbonil, Glutasyon S-transferaz, beslenme, yumurta bırakma

**Bilim Kodu:** 401.02.01

## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

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

**Suzan KASTAMONULUOĞLU**

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

**Thesis Advisor: Assoc. Prof. Ender BÜYÜKGÜZEL**

**December 2012, 37 pages**

The effect of a synthetic allylamine antifungal antibiotic terbinafine on survivorship, development, sex ratio, male and female adult longevity, fecundity and hatchability of *Galleria mellonella* L. were investigated. The effect of this antifungal on lipid peroxidation product, malondialdehyde (MDA), 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 on an artificial diets containing terbinafine at a concentration of 0.001, 0.01, 0.1 or 1.0 %. Survivorship in development stages (7th-instars, pupae and adults) of the insect were significantly decreased at all terbinafine concentration. The highest concentration of terbinafine (1.0%) significantly decreased adult yield from  $88.9 \pm 5.9$  to  $11.0 \pm 0.00\%$ , and also reduced both male and female sex ratio to  $5.5 \pm 0.00\%$ . This antifungal did not significantly affect developmental time and adult longevity. The females from control diet produced  $82.9 \pm 18.1$  eggs but this number of eggs was significantly reduced to  $51.4 \pm 9.6$  by 0.1% terbinafine.

## ABSTRACT (continued)

However, the highest concentration of terbinafine inhibited egg laying of the females. Terbinafine significantly increased MDA content and GST activity in midgut tissue of 7th-larval instar in a dose-dependent manner. Highest dietary concentration (1.0%) of terbinafine significantly increased MDA content from  $0.059 \pm 0.002$  to  $0.653 \pm 0.2$  nmol/mg protein (11-fold), GST activity from  $1.473 \pm 0.4$  to  $8.30 \pm 1.5$   $\mu$ mol/mg protein/minute (6-fold). Relative to control, low dietary concentrations of terbinafine (0.001, 0.01 and 0.1%) significantly increased midgut PCO content, 0.1% terbinafine raised this PCO content from  $155.19 \pm 21.8$  to  $737.17 \pm 36.4$  nmol/mg protein. The highest concentration of terbinafine significantly increased PCO content by 2-fold ( $315.12 \pm 35.6$  nmol/mg protein), however a decrease in PCO content was recorded according to low terbinafine concentrations. This study showed a concentration-dependent variation in biological traits of the insect, and oxidative status and detoxification capacity of midgut.

**Key Words:** *Galleria mellonella*, terbinafine, survivorship, Malondialdehyde, protein carbonyl, Glutathione S-transferase, nutrition, egg laying

**Science Code:** 401.02.01

## TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma fırsatı veren, ilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL'e (BEÜ), çalıŐmamın her aşamasında değerli bilgilerinden yararlandığım Biyoloji Bölümü öğretim üyesi, Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL'e (BEÜ) teşekkürlerimi bir borç bilirim. Yüksek Lisans tez çalıŐmam boyunca gerek deneysel gerekse yazma aşamasında moral desteği ve yardımlarını esirgemeyen aileme ve yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Bu alıŐma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüęü tarafından desteklenmiŐtir (PROJE NO: 2012100608).





## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2 MATERYAL VE METOT .....	7
2.1 BÖCEK KÜLTÜRÜ .....	7
2.2 TERBİNAFİNİN DENEYLERDE KULLANILMASI.....	7
2.3 LARVALARIN ELDE EDİLMESİ .....	8
2.4 YAŞAMA, GELİŞME, EŞEY ORANI VE ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞU .....	8
2.5 DİŞİLERİN YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI .....	8
2.6 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTESİ.....	9
2.6.1 Orta bağırsak izolasyonu .....	9
2.6.2 Malondialdehid (MDA) Miktarının Belirlenmesi .....	10
2.6.3 Protein Karbonil Miktarının Belirlenmesi .....	10
2.6.4 Glutasyon S-transferaz (GST) Aktivitesinin Belirlenmesi .....	11
2.7 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	11

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3 ARAŞTIRMA BULGULARI.....	13
3.1 TERBİNAFİNİN <i>G. MELLONELLA</i> LARVALARININ YAŞAMA VE GELİŞME ETKİSİ .....	13
3.2 TERBİNAFİNİN <i>G. MELLONELLA</i> 'NİN ERGİN EŞEY ORANINA ETKİSİ .....	16
3.3 TERBİNAFİNİN <i>G. MELLONELLA</i> 'NİN ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞUNA ETKİSİ	17
3.4 TERBİNAFİNİN <i>G. MELLONELLA</i> 'NİN YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ETKİSİ.....	18
3.5 TERBİNAFİNİN <i>G. MELLONELLA</i> ORTA BAĞIRSAĞINDAKİ MDA MİKTARINA ETKİSİ.....	20
3.6 TERBİNAFİNİN <i>G. MELLONELLA</i> ORTA BAĞIRSAĞINDA PROTEİN KARBONİL MİKTARINA ETKİSİ.....	21
3.7 TERBİNAFİNİN <i>G. MELLONELLA</i> ORTA BAĞIRSAĞINDA GST AKTİVİTESİNE ETKİSİ.....	22
BÖLÜM 4 TARTIŞMA .....	23
BÖLÜM 5 SONUÇ.....	27
KAYNAKLAR.....	29
ÖZGEÇMİŞ .....	37

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	Terbinafin'in etki basamağı ve ergosterol .....	5
3.1	Terbinafinin <i>G. mellonella</i> larva, pup, ergin gelişme süresine etkisi .....	14
3.2	Terbinafinin <i>G. mellonella</i> larva, pup, ergin yaşama oranına etkisi.....	15
3.3	Terbinafinin <i>G. mellonella</i> erginlerinin eşey oranına etkisi .....	16
3.4	Terbinafinin <i>G. mellonella</i> erginlerinin ömür uzunluğu üzerine etkisi .....	17
3.5	Terbinafinin <i>G. mellonella</i> dişilerinin yumurta verimine etkisi .....	18
3.6	Terbinafinin <i>G. mellonella</i> dişilerinin yumurta açılımına etkisi.....	19
3.7	Terbinafinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta bağırsak MDA miktarına etkisi .....	20
3.8	Terbinafinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta bağırsak protein karbonil miktarına etkisi.....	21
3.9	Terbinafinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta bağırsak GST aktivitesine etkisi.....	22



## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

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

## **KISALTMALAR**

ANOVA	: Analysis of variance
BHT	: Butillenmiş hidroksi toluen
CAT	: Katalaz
CDNB	: 1-chloro-2,4-dinitrobenzen
DNPH	: 2,4- dinitrofenilhidrazin
DTT	: Ditiyotreititol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutatyon

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

GST	: Glutasyon-S-transferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HO·	: Hidroksil radikali
KCl	: Potasyum klorür
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Dipotasyum hidrojen fosfat
L·	: Lipid radikali
LOO·	: Lipid peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksid
LSD	: Least Significant Difference
MDA	: Malondialdehid
PCO	: Protein karbonil
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBF	: Terbinafin
TBF-A	: Terbinafin-A
TCA	: Triklorasetik asit
UV	: Ultraviole
$\chi^2$	: Ki kare (Chi square)

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Zararlılarla mücadelede kimyasal tarım ilaçlarının yol açtığı çevre kirliliği, ürünlerde ilaç kalıntısı, hedef olmayan canlı gruplarının bu ilaçlardan etkilenmesi ve zararlı popülasyonlarında dirençli bireylerin gelişimine neden olması gibi pek çok problem alternatif mücadele yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Modern tarımsal uygulamalarda böceklerle mücadele için kimyasal ilaçların kullanılması kolay, pratik ve aynı zamanda etkili bir yöntem olduğu için insektisit kullanımı sürekli olarak artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütüncü zararlılarla mücadelede kullanılan çok zehirli ilaçlarında bulunduğu belirtilmiştir (Çömelekoğlu vd. 2000). Zararlı böceklerle mücadelede insektisit kullanımının tartışılmaz yararlarına karşın etkin denetimin olmadığı ve aşırı miktarlarda uygulanması insan dâhil hedef olmayan diğer canlılarda zehirlenmelere, ölümlere, ekosistemlerin ve besinlerin kirlenmesine neden olmaktadır. Kullanılan insektisit grupları arasında en yaygın olanı organik fosforlu insektisitlerdir. Bu insektisit grubunu organik klorlular, karbamatlar ve pretroidler izlemektedir. Kimyasal mücadele yöntemleri sonucu doğal dengenin bozulması, çevre kirliliği gibi olumsuzluklar son yıllarda yeni mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine ve kimyasal mücadele yöntemlerinde daha az toksik etkiye sahip olan maddelerin tercih edilmeye başlanmıştır (Godfray 1994, Conradt et al. 2002, Lemos et al. 2003, Gündüz ve Gülel 2005). Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda zirai mücadelede kullanılan pestisitlerin toprakta, suda ve atmosferde birikerek çevre kirliliğine neden olmakla birlikte insanların da dâhil olduğu tüm canlı gruplarında akut ve kronik zehirlenmeye, sinir sisteminde tahribata, enzim faaliyetlerinde bozulmalara, hücre membran yapısında değişmelere, üremeyle ilgili anormalliklere, beslenme ve beslenme alışkanlıklarıyla ilgili anormalliklere, algılamada ve davranışlarda bozulmaya, popülasyon dinamiğini bozmaya, metabolizmayı değiştirmeye, parazitlemede ve parazit çıkışında anormalliklere ve ayrıca zararlı popülasyonlarında direnç mekanizmasının gelişmesine sebep olmaktadır. (Haynes 1988, Çakır ve Yamanel 2005). Canlıların çeşitli kimyasallara veya çevre kirliliğine neden olan maddelerin etkileri altında kalmaları, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna ve dolayısıyla metabolik olayların



bozulmasına neden olur. Serbest radikaller hücrede ekzojen ve endojen kaynaklara bağlı olarak meydana gelen, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız, moleküller olarak tanımlanmaktadır. Organizmalarda serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında doğal bir denge bulunmaktadır (Mercan 2004). Bu dengenin bozulması durumunda yukarıda belirtilen çeşitli anormallikler ortaya çıkmaktadır. Ksenobiyotikler ve ksenobiyotiklerin biyoaktivasyonu sonucu oluşan ürünler serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunda ana kaynağı meydana getirmektedirler. Birçok kimyasal madde serbest radikal meydana getirerek oksidatif hasara neden olmaktadır. Oksidatif stres, serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin oksidanlar yönüne kayması durumunda oluşur (Serafini and Del Rio 2004, Mercan 2004 ).Organofosforlu insektisitler serbest radikal oluşturma ve reaktif oksijen türlerini ortan kaldıran enzimlerin yapısında da değişikliğe neden olarak oksidatif stres oluşmasını sağlamaktadır (Bagchi et al. 1995, Gültekin vd. 2001, Milatovic et al. 2006, Dettbarn et al. 2006, Kovacic 2003). Oksidatif stres sonucunda oluşan serbest radikallerin hücrede proteinler, lipitler, karbohidratlar, enzimler, nükleik asitler ve DNA üzerine önemli etkileri bulunmaktadır (Büyükkokuroğlu et al. 2001, Hermes-Lima and Zenteno-Savin 2002, Damien et al. 2004, Song 2004). Organizmalar, ksenobiyotiklerin, ilaçların ve toksik radikallerin istenmeyen etkilerine karşı antioksidan adı verilen endojen ve ekzojen kaynaklı maddeler ile korunmaktadır. Bu antioksidan maddelerin başında vitamin C, A, E,  $\beta$ -karoten, metallothionein, melatonin, bilirubin gibi moleküllerle, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSH-Rd) gibi enzimler gelmektedir (Mercan 2004).

Protein oksidasyonu, ROT'lar ( $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  gibi) ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirek olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Shacter 2000). Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna neden olabilmektedirler (Berlett and Stadtman 1997). ROT ile protein ana yapısının reaksiyonu, amino asit  $\alpha$  karbonundan bir H atomunun  $\text{OH}^\cdot$ 'e bağlanarak ayrılması ve  $\text{H}_2\text{O}$  oluşturması ile başlar (Stadtman and Levine 2003). Her ne kadar  $\text{OH}^\cdot$ 'in majör kaynağı fizyolojik şartlar altında  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin Fe veya Cu aracılığı ile ayrılması olsa da aynı reaksiyonlar iyonize radyasyon sonucu oluşan  $\text{OH}^\cdot$  ve  $\text{HO}_2^\cdot$  ile de gerçekleşmektedir. H atomunun  $\text{OH}^\cdot$ 'ne bağlanarak ayrılması karbon merkezli radikalın oluşumuna neden olur. Oluşan bu radikal, oksijen varlığında peroksil radikaline dönüşür. Peroksil radikali de kolaylıkla, süperoksit radikalının protonlanmış formu veya başka bir molekülden H atomu alarak alkil peroksite dönüşür. Alkil

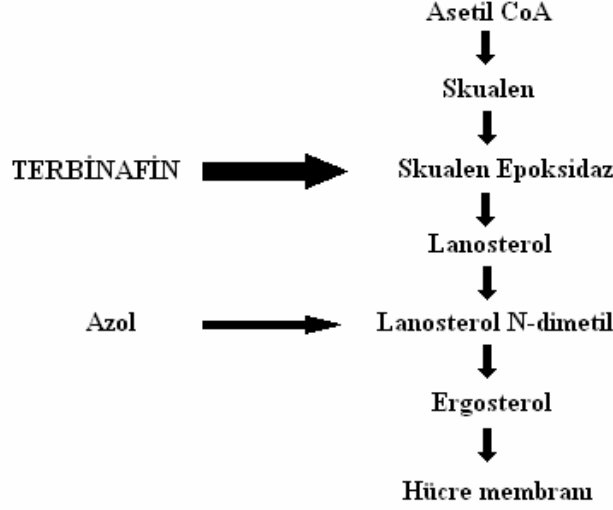
peroksit ise HO<sub>2</sub>· ile daha ileri bir reaksiyonla alkoksil radikaline ve daha sonra da alkoksil radikali yine HO<sub>2</sub>· ile hidroksi türevine dönüşür (Stadtman and Levine 2003).

Lipid peroksidasyonu reaksiyonu, serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asidi yan zincirlerinin, α-metilen gruplarından bir hidrojen atomunu koparmasıyla başlar. Bir hidrojen atomu koparılan karbonun, ortaklanmamış bir elektronu kalmakta ve serbest radikal haline dönüşmektedir. Oluşan lipid radikali (L·) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle molekül içi çift bağ aktarılması sonucunda dien konjugatları oluşur ve devam eden reaksiyonlarda; lipid radikalının zarlarda çözülmüş olarak bulunan moleküler oksijenle etkileşmesinden lipid peroksil radikali (LOO·) meydana gelir. Son derece reaktif olan peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna neden olurken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşürler. Olay bu şekilde kendi kendine katalizlenerek devam eder (Reitter 1995, Tribble et al. 1987).

Çeşitli antibiyotiklerin prokaryotik mikroorganizmalardaki etki mekanizmalarının yanı sıra, omurgalılarda reaktif oksijen türleri oluşturarak lipid peroksidasyonuna ve antioksidan enzim aktivitesinin değişimine neden olduğu bilinmektedir (Miyachi et al. 1986, Vijayalekshmy et al. 1992, Abdrashitosa and Ramanov 2001). Ökaryotik organizmalar olan fungal patojenlerdeki etki mekanizmalarının yanı sıra, flukonazol ve griseofulvin gibi bazı antifungal antibiyotiklerin bir lepidopter takımına ait tür olan *Galleria mellonella*'nın son evre larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde önemli değişimlerin olduğu tespit edilmiştir (Büyükgüzel 2007). Çeşitli antibiyotikler kullanılarak böceklerin yaşama, gelişimi üzerindeki etkileri ortaya konulmuştur. Bir antibiyotik olan novobiyosinin yüksek miktarları ile beslenen endoparasitoid bir hymenopter tür *Pimpla turionellae* larvalarının yaşama ve gelişimi de olumsuz yönde etkilenirken bu maddenin denenen en düşük miktarı böceğin yaşama oranını önemli derecede artırmıştır (Büyükgüzel 2001). Böcek kültür ortamlarında besinlere ilave edilen antimikrobiyal maddelerin besin ile birleştiğinde besinin kimyasal yapısında değişikliklere sebep olarak larvaların besin almasını etkilediği bilinmektedir (Singh and House 1970). Böceklerin alkali ve geniş bir indirgenme-yükseltgenme potansiyelinde sahip orta bağırsak antibiyotiklerin sindirimi sırasında meydana gelen ROT'ların oluşumuna yardımcı olabilir (Terra et al. 1996). Orta bağırsak, sindirim enzimlerinin salgılandığı ve besinlerin sindirilerek emilime uğradığı böceklerin önemli bir bölümüdür (Sehnal and Zitnan 1996). Bazı böcek türlerinin larvalarında

allelokimyasalların sindirimi ile meydana gelen reaktif oksijen türlerinin orta bağırsak hücrelerinde oksidatif hasara neden olduğu ve aynı zamanda antioksidan enzim sistemi üzerinde olumsuz yönde bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Perić-Mataruga et al. 1997, Krishnan and Sehna 2006, Krishnan et al. 2007). Böceklerin yağ dokusu ve diğer bazı dokularında antibiyotiklerin oksijenaz enzimleri ile oksidasyonu sırasında da yan ürün olarak ROT'lar oluşabilir (Graf and Benz 1970).

Terbinafin (TBF) insan ve hayvanlarda deri, saç ve tırnağın fungal patojenlerine (dematofitler, mantar, küf, maya) karşı oral ve topikal olarak geniş antifungal etki spektrumu olan sentetik bir allilamin olup yaptığı skualen epoksidaz (sitokrom olmayan P450) enziminin spesifik inhibisyonu sayesinde mantar hücre duvarının önemli bileşeni olan ergosterolün oluşumunu engeller (Petronyi et al. 1987, Ryder 1992, Özkan et al. 2003, Ryder and Favre 1997). Bu arada meydana gelen skualen birikimi ve ergosterol yetersizliği sonucunda mantar hücresi üzerinde fungisid etki elde edilmiş olur (Back and Tjia 1991, Ghannoum and Rice 1999). Skualen epoksidaz zara bağlı bir enzim olup skualeni, skualen 2,3-epokside dönüştürür sonrasında skualen 2,3-epoksid lanosterole, lanosterol de ergosterole dönüşür (Şekil 1) (Gokhale and Kulkarni 1999). Skualen epoksidaz enzimi sitokrom P450 (CYP) grubundan olmadığı için terbinafin P450 enzimini inhibe etmemektedir. Dolayısıyla terbinafin, P450 ile metabolize edilen hormonların ve başka ilaçların siklosporin, terfenadin, triazolam metabolizmasını etkilemez. İlaç oral olarak verildiğinde, yüksek oranda lipofilik olmasından dolayı deri, saç ve tırnaklarda fungisidal aktivite oluşturacak düzeyde konsantre olur. Mantar hücresinin skualen epoksidaz enzimi üzerine olan etkinliğinin aynısını memeli skualen epoksidazı üzerinde gösterebilmesi için dozunun 4.000 kat artırılması gerektiği yapılan in vitro çalışmalarda gösterilmiş olup terapötik aralığının geniş olduğu böylelikle ortaya konmuştur. Oral alımı takiben % 70 oranında absorbe edilir, plazma doruk düzeyine 1-2 saatte ulaşır. Terbinafin plazma proteinlerine % 99 oranında güçlü olarak bağlanır. Terbinafin memelilerde iyi tolere edilir; meydana gelen yan etkiler hafif ve geçici özelliktedir (Balfour and Faulds 1992).



Şekil 1.1 Terbinafin'in etki basamağı ve ergosterol (Balfour and Faulds 1992).

Terbinafin, en az 7 adet P450 (CYP) izoenzimi tarafından hızla ve büyük oranda metabolize edilir. Biyotransformasyon sonucunda başlıca üriner yoldan atılan, antifungal etkisi olmayan metabolitler oluşur. Bu antifungalın metabolizması karaciğerin toplam sitokrom P450 kapasitesinin % 5'inden daha azdır (Balfour and Faulds 1992). Diğer antifungaller (ketokonazol, flukonazol, itrakonazol) ile karşılaştırıldığında terbinafin diğer ilaçlar ile düşük oranda etkileşime girer (Kantarcioglu ve Yücel 2003). Terbinafin aynı zamanda bazı deneysel hayvan modellerinde parazitik protozoonların hücre zarında bulunan ergosterollerin sentezini önleyerek bu hayvanlardaki enfeksiyonları kontrol ettiği gösterilmiştir (Hankins et al. 2005, Zakai and Zimmo 2000). Terbinafin düşük konsantrasyonlarda (90-120  $\mu$ M) bazı tümörlü hücrelerde ve insan vasküler endotel hücrelerinde hücre devrini G0/G1 fazında tutarak antitümör ve ayrıca antianjiyogenik aktivite göstermiştir (Ho et al. 2006, Lee et al. 2003). Diğer antifungallerden ketokonazol G0/G1 fazında hücre devrini durdurarak karaciğer ve kolon kanserinde hücrelerin apoptoza girmelerini sağlarken griseofulvin normal mikrotübül polimerizasyonu ile birlikte G2/M fazında hücre devrini durdurarak apoptozu başlatır (Lee et al. 2003). Terbinafinin, insanlarda gerek yan etkilerinin son derece düşük olması ve gerekse fungal direnç söz konusu olduğunda griseofulvine kıyasla daha etkin ve daha hızlı bir terapötik sonuç vereceğinin bilinmesi nedeniyle kullanımı yaygındır (Kotnik 2000). Terbinafinin tarımsal zararlı böceklerin mücadelesinde kullanımı ve depolanmış ürün zararlılarına etkileri hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma insan sağlığı açısından önemli antifungallerin çevreye ve hedef olmayan diğer canlılara karşı güvenli bir

şekilde zararlı böceklerin mücadelesinde insektisit olarak kullanılmasını araştırması açısından önemlidir.

Allilamin grubu bir antifungal antibiyotik olan terbinafinin *G. mellonella* 7. evre larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyon ve protein oksidasyonu düzeyleri ile detoksifikasyon enzimi glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, ayrıca terbinafinin böceğin yaşama oranı, gelişme süresi, eşey oranı, ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı üzerindeki olumsuz etkilerinin orta bağırsakta bu antiantifungal antibiyotiğin oluşturduğu oksidatif stres ile ilişkisi araştırılmıştır.

## BÖLÜM 2

### MATERYAL VE METOT

#### 2.1 BÖCEK KÜLTÜRÜ

Deneyleerde bölümümüz laboratuvarında bulunan büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) erginleri tarafından bırakılan yumurtalardan yeni çıkmış larvalar (birinci evre) kullanıldı. Kültür,  $28 \pm 2$  °C ve %  $65 \pm 5$  bağıl nemi gösteren inkübatörde gün boyunca sürekli karanlıkta gerçekleştirildi. *G. mellonella* larvalarını laboratuvar koşullarında yetiştirmek için Bronskill (1961) tarafından geliştirilen yapay besin kullanıldı. Besin içeriği, 420 g buğday kepeği, 150 ml süzme bal, 150 ml gliserin, 20 g öğütülmüş koyu renkli eski petek ve 30 ml saf sudan meydana gelmektedir. Besinin bileşenleri homojen bir şekilde karıştırılarak karışım hazırlandı. Hazırlanan bu besin 80x 180mm ebatlarındaki bir litrelik cam kavanozların üçte biri kadar dolduruldu. Bu kavanozların içine 10-15 adet ergin bırakılarak ağızları tel kafes yerleştirilmiş kapak ile kapatıldı (Ortel 1995). Ortalama 25-30 gün sonra 7.evre larvaları ayrılarak pup olmaları için başka bir kavanoza aktarıldı (Campos et al. 1990). Meydana gelen puplardan yaklaşık 7-8 gün sonra ergin bireyler oldu. Bu erginlerin çoğunluğu böcek kültürünün devamı için kullanıldı. Bir kısmı ise terbinafin ile ilgili beslenme çalışmaları için kullanıldı.

#### 2.2 TERBİNAFİNİN DENEYLERDE KULLANILMASI

Çalışmada kullanılan terbinafin (terbinafin hidroklorür, beyaz kristal toz, % 99,5, C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>ClN) [(E)-N-(6,6-dimetil-2-hepten-4-inil)-N-metil-1-naftalenmetanamin hydrochloride] Abdi İbrahim ilaç firması tarafından ücretsiz olarak temin edildi. Terbinafinin besine ilave edilmesi ile yürütülen beslenme deneylerinde denenen miktarların konsantrasyonu 100 g besin başına antibiyotik miktarı olarak ifade edildi. Terbinafin besin hazırlanması sırasında doğrudan besine ilave edildi. Kontrol besini (terbinafin içermeyen) hariç terbinafinin *G. mellonella* için 0,001, 0,01, 0,1 ve 1g olmak üzere dört farklı konsantrasyonu denendi. Kontrol besinine ise terbinafin konulmadı.

### **2.3 LARVALARIN ELDE EDİLMESİ**

Beslenme deneylerinde kullanılan *G. mellonella* larvalarının elde edilmesinde, 30 ml'lik geniş ağızlı, vida kapaklı bir plastik kabın (ORLAB, 35x55 mm) iç yüzeyine dişiler tarafından bırakılan yumurtaların açılması ile elde edildi. Delikli kapakları olan bu plastik kaplara 2-3 dişi birey konularak stok kültürün devam ettirildiği ortam koşullarında bekletildi. Yumurtaların açılması ile serbest kalan larvalar ucu gliserine batırılarak nemlendirilmiş yumuşak uçlu bir fırça (No:0, Goya Toray) ile daha önceden hazırlanmış, içerisinde 200 g besin bulunan cam kavanozlara (60x120 mm) her kavanozda 20 larva olacak şekilde aşılandı.

Bu şekilde larvaların besin aracılığıyla aldığı terbinafinin ergin evreye kadar yaşama oranı ve gelişme süreleri ile erginlerin eşey oranı, ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranına, son evre larvalarının orta bağırsak dokusunda protein karbonil miktarı, MDA miktarı ve GST aktivitesine etkisi incelendi.

### **2.4 YAŞAMA, GELİŞME, EŞEY ORANI VE ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞU**

Kontrol besin ve terbinafin içeren diğer besinler cam kavanozlara (60x120) konuldu. Her bir besin için 20 larva kullanıldı ve deneyler dört defa tekrarlandı. Farklı konsantrasyonlarda terbinafin bulunan besinlerde gelişimlerini tamamlayan olgun *G. mellonella* larvaları (7. evre) alınarak pup olmak üzere 30 ml'lik delikli kapaklı plastik örnek kaplarına her kapta bir larva olacak şekilde bırakıldı. Kapların içerisine larvaların pup olması için kuru ortam oluşturmak amacıyla katlanmış ince pelur kağıdı konuldu. Son larva evresine ulaşan larva oranı ile her bir larvanın son evreye ulaşması için geçen süre (gün) kaydedildi. Pup olan bireylerin oranı, pup olma süreleri, bu puplardan gelişen bireylerin oranı, ergin olma süreleri belirlendi. Ayrıca erginlerin abdomenlerinin son segmentindeki genital yapıya göre eşey ayrımı yapıldı.

### **2.5 DIŞİLERİN YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI**

Terbinafinin farklı konsantrasyonlarını içeren besinle yetiştirilen *G. mellonella* dişilerinin yumurta verimine etkisini incelemek için yumurtadan yeni çıkan larvalar, ergin evreye kadar beslendi. *G. mellonella* dişileri delikli kapaklı, geniş ağızlı, plastik kaplara her kapta bir dişi olmak üzere bırakıldı. *G. mellonella* erginleri besin almadığı (Charriere and Imford 1997) için bu dişilere yumurta bırakma süresince besin verilmedi. Dişilerin yumurta verimini ve açılma

oranını belirlemek için, dişi bireylerin ilk iki gün içerisinde bıraktıkları yumurtalar sayıldı. Yumurta üretimi, bir günde dişi başına bırakılan yumurta sayısı ele alınarak değerlendirildi ve dişinin verimliliği olarak ifade edildi. Her gün açılan larvalar sayılarak yumurtaların açılma oranı tespit edildi.

Besinin hazırlanması ve larvaların aşılması kısa bir günlük inceleme periyodu hariç beslenme deneylerinin tümü böceklerin stok kültürünün yetiştirildiği şartlarda yapıldı. Besinin hazırlanması, yumurtaların elde edilmesi ve bu yumurtalardan çıkan larvaların besine aşılması işlemleri tamamen aseptik olmayan şartlarda gerçekleştirildi (İçen et al. 2005, Büyükgüzel et al. 2007, Büyükgüzel and Kalender 2007). Laing ve Hagen (1970)'nin meyve güvesi *Grapholitha molesta* (Busck) ile Campos vd. (1990)'ın mısır kurdu *Ostrinia nubilalis* (Hübner) için kullandığı yöntemler temel alınarak ve bir ölçüde değiştirilerek bu işlemler uygulandı. Deneylerde kullanılan besin kaba bir besin olması ve aynı zamanda bir çok lepidopter türünün birinci evre larvalarında olduğu gibi *G. mellonella* larvalarının da ilk evrelerinde besin ortamında ölüm oranının yüksek olması, ölen larvaların içlerinin boş olarak kurumaması ve göz ile görülemediği için besine aşılana her bir larvanın olgun evreye ulaşmaya kadar günlük olarak takip edilememiştir (Zalucki et al. 2002). Bundan dolayı yaşama oranı tespit edilirken yaşayan larva sayısı besine başlangıçta aşılana larvaların sayısı kabul edildi.

## **2.6 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTESİ**

Terbinafinin farklı konsantrasyonlarını içeren besinler ile yetiştirilen *G. mellonella* 7. evre larvalarının orta bağırsak dokusu izole edilerek lipid peroksidasyon ürünü MDA ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil miktarları ile GST aktivitesi tespit edildi. Deneyler dörder defa tekrarlandı ve her bir tekrarda 15 ortabağırsak kullanıldı.

### **2.6.1 Orta bağırsak izolasyonu**

Son evre larvaları buz üzerinde 5 dk bekletildikten sonra % 95 etil alkol ile dezenfekte edildi ve parafinle doldurulmuş petri kabına sırt kısmı parafine gelecek şekilde sabitlenerek larvaların birinci çift torasik bacaklarının önünden itibaren üçüncü abdominal bacak çiftine kadar karın kısmından orta eksen boyunca uzunlamasına diseksiyon makası ile kesildi ve stereomikroskop altında sindirim kanalı çıkarıldı. Üç bölümden oluşan sindirim kanalından



orta bağırsak, ön ve son bağırsaktan ayrıldı. Streomikroskop altında orta bağırsağa tutunmuş yağ dokusu, 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 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 5 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenilmetilsülfonil (PMSF), 2 mM ditiyotreitöl (DTT), pH: 7,4] bulunan bir ependorf tüpe alındı ve tüpler -80 °C' de saklandı.

### **2.6.2 Malondialdehid (MDA) Miktarının Belirlenmesi**

532 nm'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren lipid peroksidasyonun son ürünü MDA miktarı belirlendi (Jain ve Levine 1995). Orta bağırsaklar % 1,15'lik KCl ile ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile parçalandı. Daha sonra örneklerin üstüne pH 7,4 olan fosfat tamponu (18 mM NaCl, 18 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,04 M butillenmiş hidroksi toluen (BHT), % 30'luk triklorasetik asit (TCA)] eklenerek 2 saat buzun içerisinde bekletildi. 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 örneklerin 532 nm'de spektrofotometre ile (Shimadzu 1700 UV/Vis, Kyoto, Japan) absorbansı okundu. MDA miktarı  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

### **2.6.3 Protein Karbonil Miktarının Belirlenmesi**

Orta bağırsak dokularının üzerine pH 7,4 olan 1 ml homojenizasyon tamponu konuldu. Ultrasonik homojenizatörde 2 kez karıştırıldı. Elde edilen özüt 1000 x g' de 4°C' de 10 dk santrifüjlendi. Üst sıvı alınıp % 10'luk streptomisin sülfat ilave edilerek 37°C'de 15 dk benmaride bekletildi. Örnek 8000 x g' de 4°C' de 10 dk santrifüjlendi, nükleik asitler çökteldi ve üst sıvı alındı. Yaklaşık 200 µl örnek 2ml' lik ependorfa konuldu ve üzerine 800 µl 10 mM dinitrofenilhidrazin (DNPH) eklendi. Kör tüpe ise 800 µl 2M HCl eklendi. Sonra tüpler 37°C' de 15 dk (benmaride) karanlıkta inkübe edildi. Her 5 dk da bir vortekslendi. Daha sonra 700 µl % 20 Triklorasetik asit her bir tüpe eklendi ve 10 dk buz üzerinde karanlıkta bekletildikten sonra 10000 x g' de 4°C' de 10 dk santrifüjlendi. Üst sıvı atıldı, dipteki pelette 2,4- DNPH ürünleri bulunmaktadır. Pellet üzerine 3 defa 1:1 oranında etanol: etilasetat solüsyonundan 1ml eklendi ve iyice süspanse edildi. Nazikçe vortekslendi ve her defasında

10000 x g' de 4°C' de 10 dk santrifüjlendi ve üst sıvı atıldı. Pelletin üzerine 2,5 ml 6 M Guanisin hidroklorid eklendi ve iyice karıştırıldı. Protein 10 dk 37°C' de karıştırılarak çözüldü. Total protein tayini için 150 µl'lik kısmı başka bir tüpe ayrıldı. Kalan süspansiyonda çözünmemiş partikülleri çöktürmek için 10000 x g 10 dk 4°C'de santrifüjlendi. Örneklerin üst berrak sıvısı ve kör tüp spektrofotometre 370 nm'de absorbansı okundu (Levine 1994, Krishnan and Kodrik 2006). Total protein için alınan 150µl örnekler üzerine 1350µl guanidin hidroklorit eklendi. Kör tüp olarak 1,5 ml guanidin hidroklorit kullanıldı. 6 M guanidin ile hazırlanan BSA standartlarına göre 280 nm'de spektrofotometrede absorbansları okundu.

#### **2.6.4 Glutasyon S-transferaz (GST) Aktivitesinin Belirlenmesi**

GST aktivitesinin ölçümünde Habig et al. (1974) tarafından geliştirilen metod uygulandı. CDNB 340 nm'de yükselen absorbans gösteren glutasyon oksidasyonunu katalizleyen GST enzimi için substrat olarak kullanıldı. Bu enzimin aktivitesinin ölçülmesi için 100 µl süpernatant 3 ml'lik cam küvet içine konuldu ve üzerine 2500 µl fosfat tamponu ilave edildi. Daha sonra küvet spektrofotometreye konuldu ve üzerine 200 µl 20 mM GSH ve 150 µl 25 mM CDNB ilave edilerek 340 nm' de 2 dakika boyunca yükselen absorbansları okundu. Enzimin spesifik aktivitesi µmol/mg protein/dk olarak ifade edildi.

GST aktivitesi ve MDA miktarını mg protein başına vermek için Folin Lowry methodu (Lowry et al. 1951) kullanılarak total protein tayini yapıldı.

#### **2.7 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Farklı konsantrasyonlarda terbinafin içeren besinler ile yetiştirilen *Galleria mellonella*'nın gelişme süresi, erginlerin ömür uzunluğu, dişilerin yumurta verimi ve yumurtaların açılma oranı, 7. evre larvalarının orta bağırsaktaki MDA, protein karbonil miktarı ve GST aktivitesi ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü "Varyans Analizi" (ANOVA) (SPSS 1997), ortalamalar arasındaki farkın önemini saptamak için "LSD Testi" (SPSS 1997), yaşama ve eşey oranı ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde ise " $\chi^2$  (Chi square) Testi" (Snedecor and Cochran 1989) kullanıldı. Ortalamaların önemi 0,05 olasılık seviyesinde değerlendirildi. Şekiller üzerinde ifade edilen harflendirmelerde aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir.

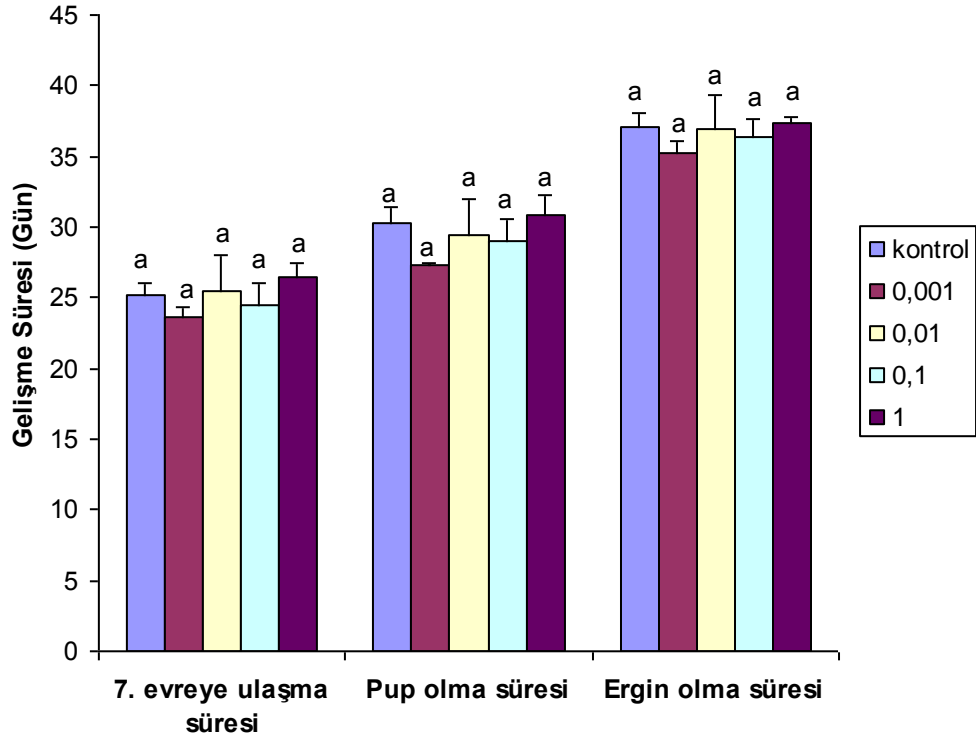


## BÖLÜM 3

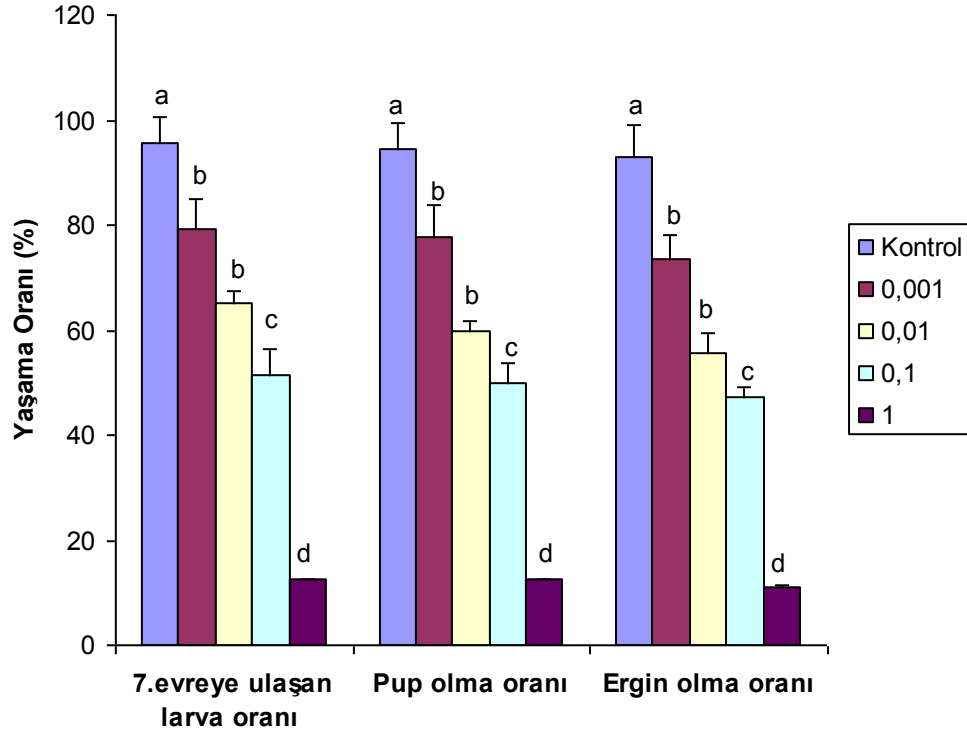
### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1 TERBİNAFİNİN *G. MELLONELLA* LARVALARININ YAŞAMA VE GELİŞME ETKİSİ

Bu çalışmada denenen terbinafin konsantrasyonları böceğin 7. evreye ulaşan larva oranını, pup ve ergin olma oranını önemli derecede azaltmıştır. Kontrol besininde %  $88,9 \pm 5,9$  oranında ergin elde edilmesine rağmen terbinafinin en düşük miktarını (% 0,001) içeren besin bu oranı %  $70,8 \pm 4,5$ 'e düşürmüştür. Denenen en yüksek terbinafin konsantrasyonu (%1,0) ise ergin olma oranını %  $11,0 \pm 0,00$ 'e azaltmıştır. Denenen terbinafin konsantrasyonları 7. evreye, pup ve ergin evrelerine ulaşmak için gereken süre üzerinde önemli bir etki yapmamıştır. Terbinafinin en düşük besinsel konsantrasyonu böceğin tüm gelişme evrelerine ulaşmak için gereken süreyi kısaltmasına rağmen bu kısalma istatistiksel açıdan anlamlı olmamıştır (Şekil 3.1, 3.2).



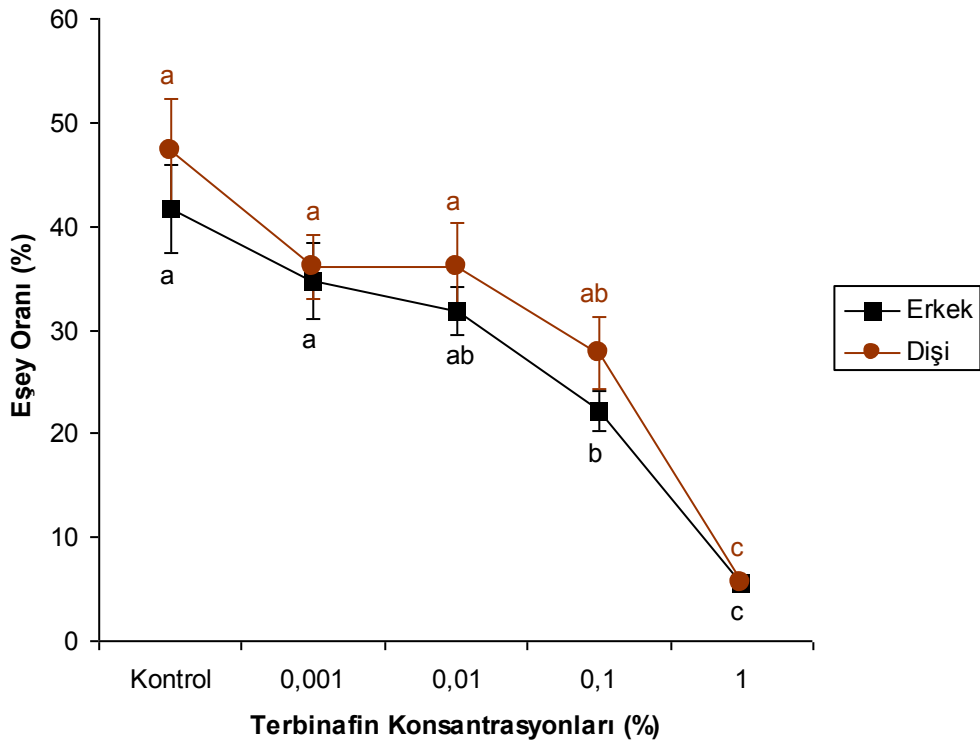
Şekil 3.1 Terbinafinin *G. mellonella* larva, pup, ergin gelişme süresine etkisi.



Şekil 3.2 Terbinafinin *G. mellonella* larva, pup, ergin yaşama oranına etkisi.

### 3.2 TERBİNAFİNİN *G. MELLONELLA*'NİN ERGİN EŞEY ORANINA ETKİSİ

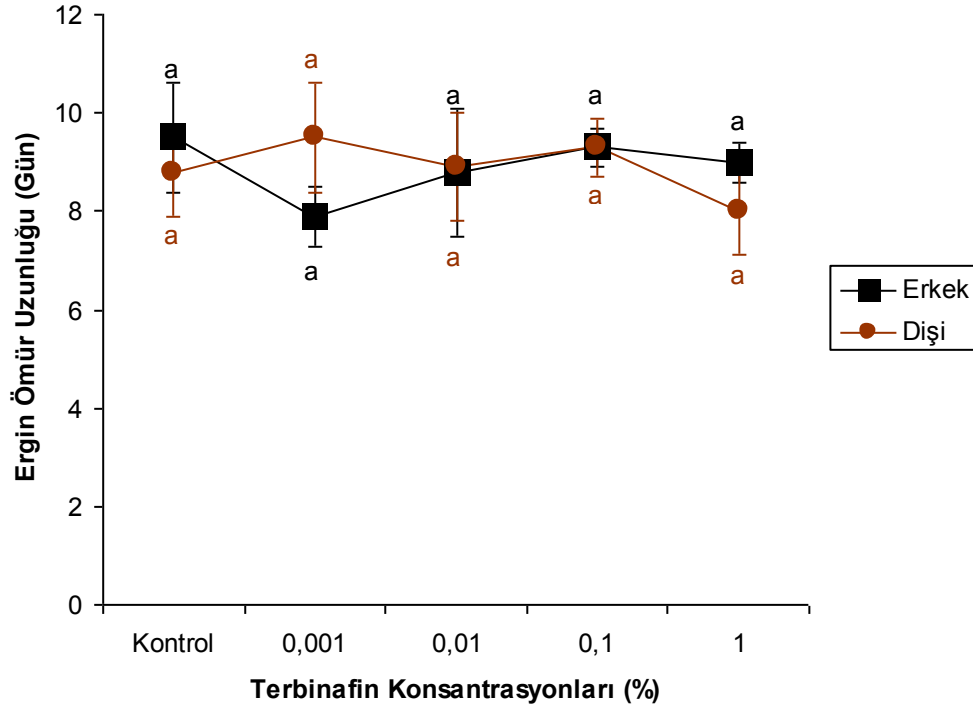
Düşük terbinafin konsantrasyonlarını içeren besinlerde (%0,001; 0,01) erkek ve dişi birey oranında istatistiksel olarak anlamlı bir etki gözlenmemiştir. Buna karşılık, terbinafinin en yüksek konsantrasyonu olan % 1,0'ini içeren besin hem erkek hem de dişi oranını %  $5,5 \pm 0,0$ 'e önemli derecede düşürmüştür (Şekil 3.3) Terbinafinin 0,1'lik konsantrasyonu diğer düşük terbinafin konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Terbinafinin en yüksek konsantrasyonu (%1,0)'lık eşey oranını önemli derecede azaltmıştır.



Şekil 3.3 Terbinafinin *G. mellonella* erginlerinin eşey oranına etkisi.

### 3.3 TERBİNAFİNİN *G. MELLONELLA*'NİN ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞUNA ETKİSİ

Tüm terbinafin konsantrasyonları kontrol besin ile karşılaştırıldığında erkek ve dişi erginlerin ömür uzunluğu üzerinde önemli bir etki göstermemiştir (Şekil 3.4). Terbinafinin % 0,001'lik konsantrasyonu erkeklerin ömür uzunluğunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 gün kısaltmaya sebep olsa da bu etki istatistiksel olarak önemli olmamıştır. Benzer etkiler terbinafinin diğer konsantrasyonları tarafından dişi ömür uzunluğu üzerinde de ortaya çıkarılmıştır.

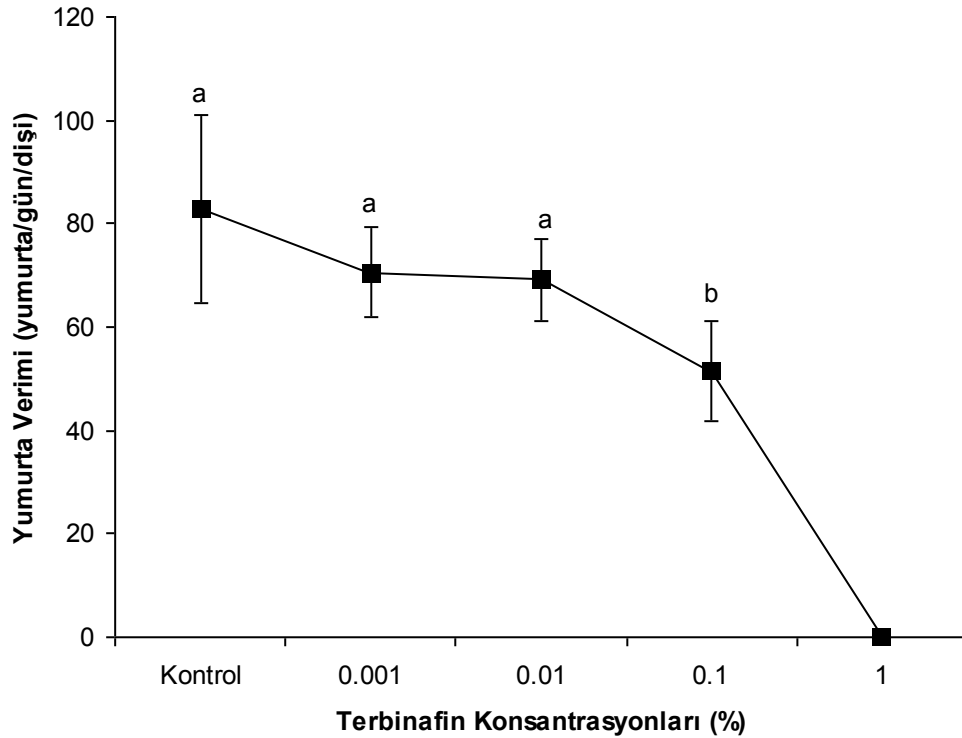


Şekil 3.4 Terbinafinin *G. mellonella* erginlerinin ömür uzunluğu üzerine etkisi.

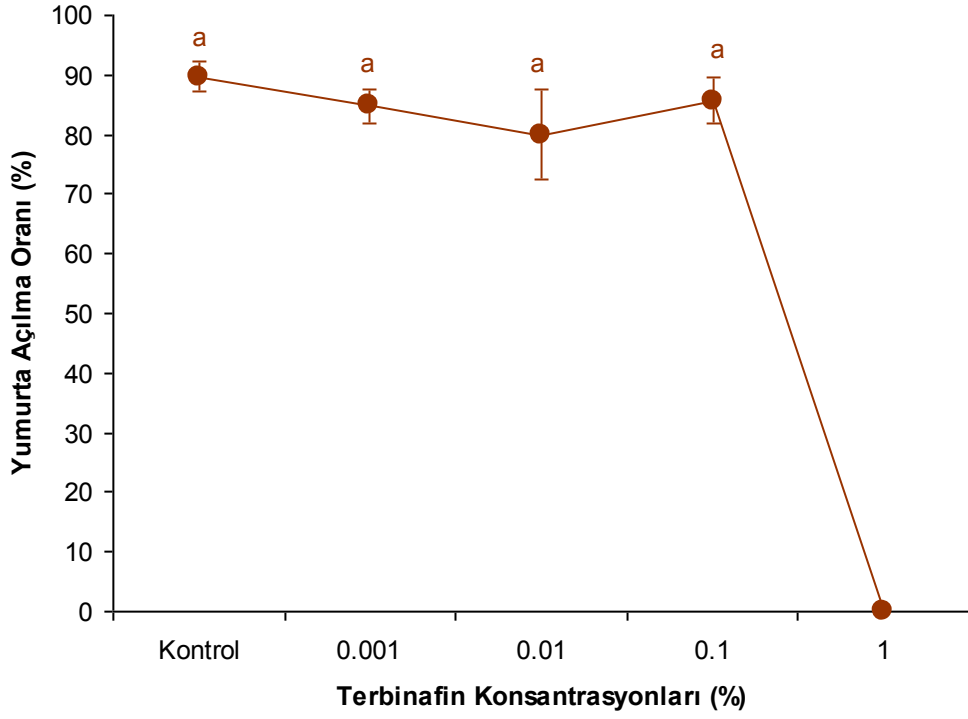


### 3.4 TERBİNAFİNİN *G. MELLONELLA*'NİN YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ETKİSİ

Kontrol besine göre, terbinafinin % 0,001 ve 0,01 içeren besinlerinin yumurta veriminde azalmaya neden olmalarına karşın istatistiksel olarak önemli bir etki ortaya çıkmamıştır. Terbinafinin besindeki miktarı on katı artırıldığında (% 0,1) yumurta sayısı  $51,4 \pm 9,6$ 'e önemli derecede azalmıştır. Buna karşılık terbinafinin denenen en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) ile yetiştirilen dişilerin hiç biri yumurta bırakmamıştır (Şekil 3.5). Terbinafin içermeyen kontrol besiniyle karşılaştırıldığında, terbinafinin denenen konsantrasyonları yumurtaların açılma oranı üzerinde önemli bir etki yapmamıştır. Kontrol besini ile yetiştirilen dişilerin bıraktığı yumurtaların %  $89,7 \pm 2,6$ 'si açılmış, terbinafinin diğer konsantrasyonlarında bu açılma oranı yine yaklaşık % 80 oranında olmuştur (Şekil 3.6).



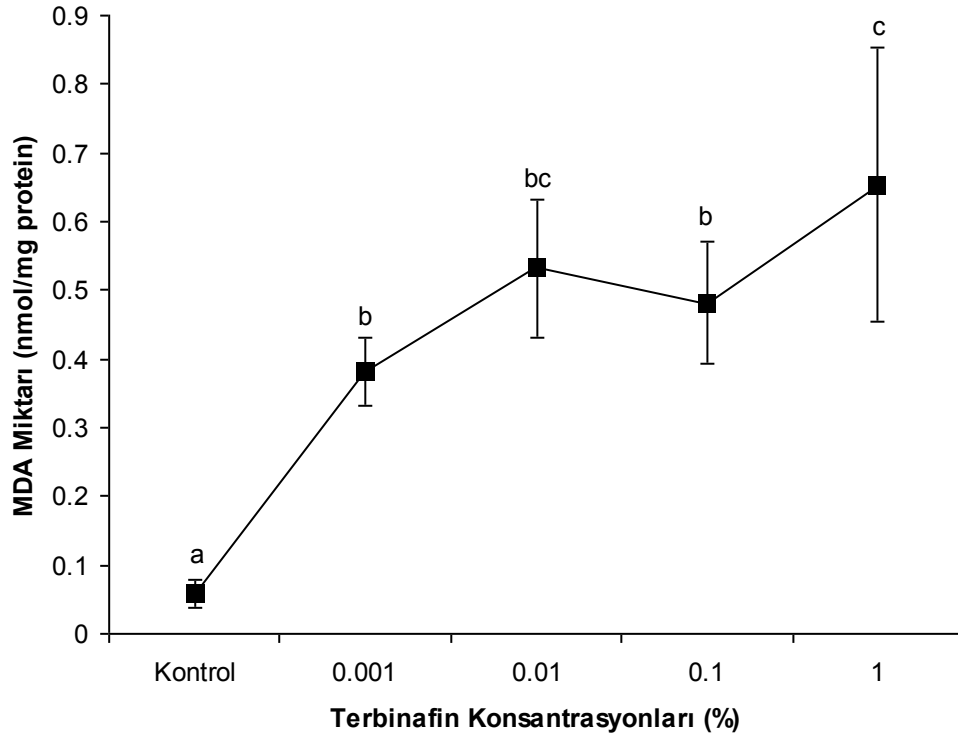
Şekil 3.5 Terbinafinin *G. mellonella* dişilerinin yumurta verimine etkisi.



Şekil 3.6 Terbinafinin *G. mellonella* dişilerinin yumurta açılımına etkisi.

### 3.5 TERBİNAFİNİN *G. MELLONELLA* ORTA BAĞIRSAĞINDAKİ MDA MİKTARINA ETKİSİ

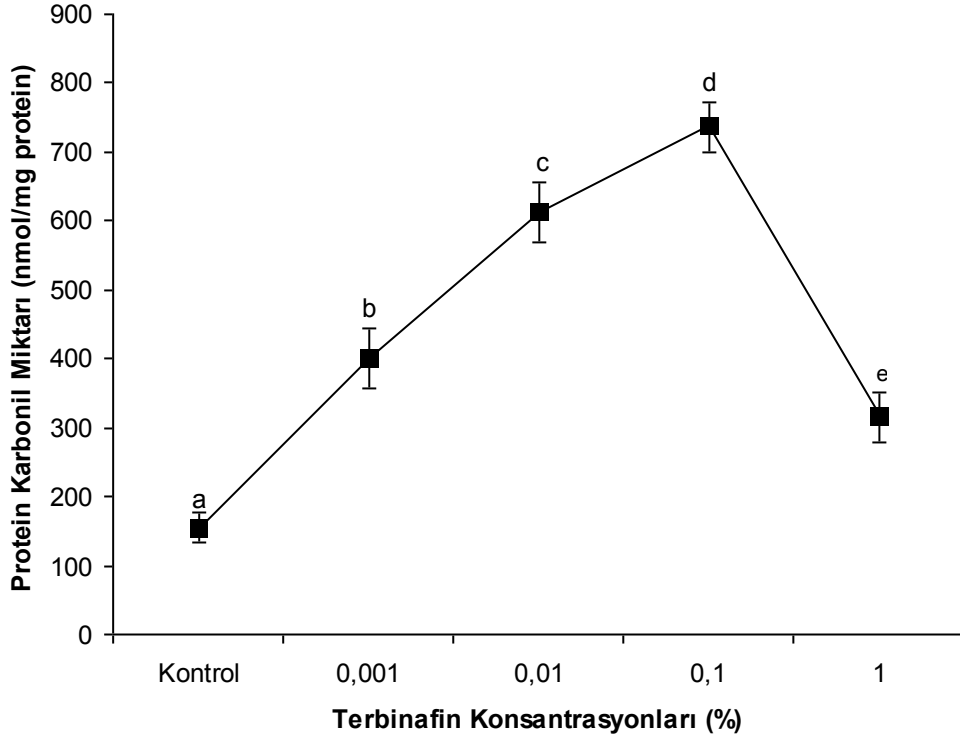
Denenen tüm terbinafinin konsantrasyonları kontrol besini ile karşılaştırıldığında 7. evre larvalarının orta bağırsak MDA miktarını önemli derecede yükseltmiştir. Denenen en düşük terbinafin konsantrasyonu kontrole göre yaklaşık 6 katı oranında artırmıştır. Terbinafinin % 0,01 ve 0,1'lik konsantrasyonları da orta bağırsak MDA miktarını sırasıyla 9 ve 8 katı artırmıştır (Şekil 3.7). Terbinafinin denenen en yüksek miktarını (% 1,0) içeren besin MDA miktarını  $0,059 \pm 0,002$  nmol/mg protein'den  $0,653 \pm 0,2$  nmol/mg proteine yaklaşık 11 katı oranında önemli derecede yükseltmiştir.



Şekil 3.7 Terbinafinin *G. mellonella*'nın orta bağırsak MDA miktarına etkisi.

### 3.6 TERBİNAFİNİN *G. MELLONELLA* ORTA BAĞIRSAĞINDA PROTEİN KARBONİL MİKTARINA ETKİSİ

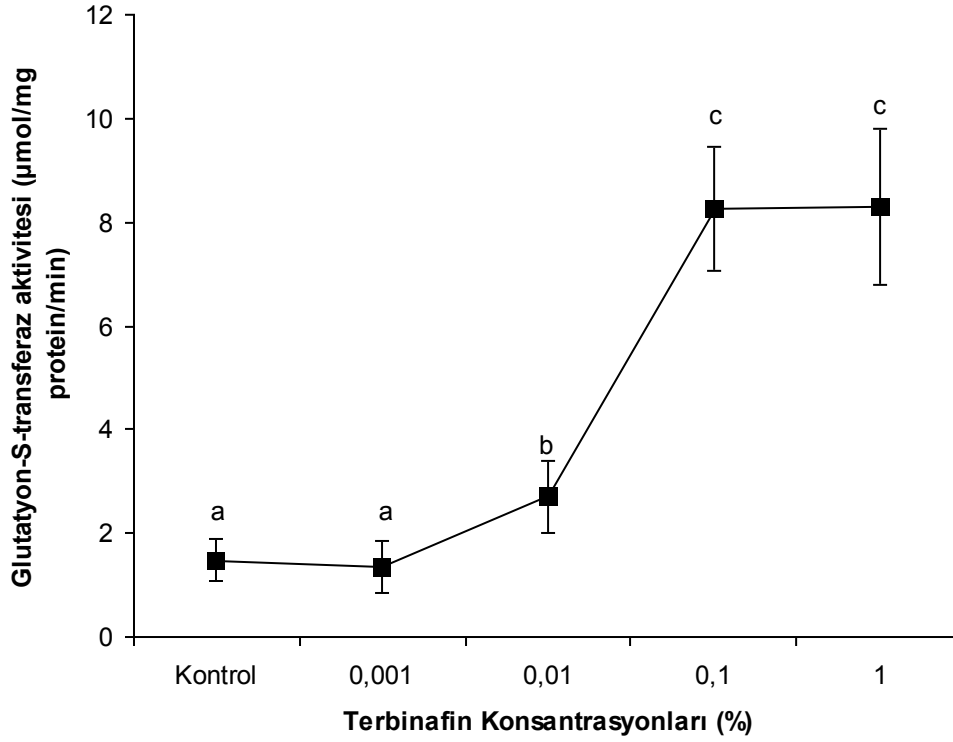
Protein karbonil miktarı, kontrol besini ile yetiştirilen larvaların orta bağırsağında  $155,19 \pm 21,8$  nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Terbinafinin en düşük konsantrasyonunda protein karbonil miktarı  $401,67 \pm 43,2$  nmol/mg protein'e yükselmiştir. Terbinafinin % 0,01 ve 0,1'lik konsantrasyonlarında ise protein karbonil miktarlarını sırasıyla  $613,18 \pm 44,0$  ve  $737,17 \pm 36,4$  nmol/mg protein olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.8). Terbinafinin en yüksek konsantrasyonunu içeren besin, terbinafinin düşük konsantrasyonlarına göre protein karbonil miktarını düşürmüştür. Ancak bu besin, protein karbonil miktarını kontrol besinine göre 2 katı oranında önemli derecede artırmıştır ( $315,12 \pm 35,6$  nmol/mg protein)



Şekil 3.8 Terbinafinin *G. mellonella*'nın orta bağırsak protein karbonil miktarına etkisi.

### 3.7 TERBİNAFİNİN *G. MELLONELLA* ORTA BAĞIRSAĞINDA GST AKTİVİTESİNE ETKİSİ

GST aktivitesi, kontrol besininde  $1,47 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/mg}$  protein/dk olarak tespit edilmiştir. Terbinafin % 0,001'lik konsantrasyonu GST aktivitesini azaltmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olmamıştır. Fakat terbinafinin % 0,01, 0,1 ve 1,0'lik konsantrasyonları GST aktivitesini önemli derecede yükseltmiştir (Şekil 3.9). Terbinafinin % 0,01'lik konsantrasyonu GST aktivitesini yaklaşık 2 katı oranında arttırırken % 0,1 ve 1,0'lik besinsel konsantrasyonları GST aktivitesini kontrole göre yaklaşık 6 katı oranında arttırmıştır.



Şekil 3.9 Terbinafinin *G. mellonella*'nın orta bağırsak GST aktivitesine etkisi.

## BÖLÜM 4

### TARTIŞMA

Terbinafinin böceğin yaşama oranı, gelişme süresi, eşey oranı, ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı üzerindeki olumsuz etkilerini ve orta bağırsakta bu antifungal antibiyotiğin oluşturduğu oksidatif stres ile ilişkisi araştırılmıştır. Daha önceden yaygın kullanıma sahip antifungal antibiyotikler olan flukonazol ve griseofulvin, *G. mellonella*'nın besinsel karışımlarına ilave edilerek böceğin yaşam parametreleri ile son evre larvalarının orta bağırsak oksidan ve antioksidan tepkisi üzerine etkisi çalışılmış olup (Büyükgüzel ve Kalender 2007 basılmamış veriler, Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009), sentetik bir allilamin olan antifungal antibiyotik terbinafinin böcek üzerindeki etkisi ise bilinmemektedir. Bu çalışmanın sonuçları, böceğin ergin özellikleri üzerine terbinafinin olumsuz etkisinin oksidatif stresten kaynaklanabileceğini göstermektedir. Terbinafinin en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) yaşama oranını olumsuz yönde etkilerken, larvaların orta bağırsak MDA ve protein karbonil miktarı ile GST aktivitesini de önemli derecede yükseltmiştir. Oksidatif stres durumunda meydana gelen reaktif moleküllere karşı antioksidan enzimler aşırı duyarlı olduklarından (Pigeolet et al. 1990), terbinafinin bu yüksek konsantrasyonu tarafından oluşturulan serbest radikaller GST enziminin aktivitesini yükseltmiş olabilir. Oksidatif strese karşı meydana gelen direncin artması sonucu *Drosophila melanogaster* (Meigen)'de glutatyona bağımlı enzimlerin (GST ve GPx) aktivitelerinde artış gözlenmiş ve bu meydana gelen oksidatif stres sonucu ömür uzunluğunda artma tespit edilmiştir (Parkes et al. 1993, Sohal et al. 1995, Sun et al. 2002). Büyükgüzel (2006) *Pimpla turionellae* erginlerinde SOD aktivitesindeki ve ömür uzunluğundaki artışı organofosforlu insektisitlerin öldürücü olmayan dozlarına karşı böceğin verdiği bir tepki olarak değerlendirmiştir. Benzer bir sonuç da *Salix exigua*'nın erginlerinde tespit edilmiştir. Uzun süre fenitrotiyona maruz bırakılan böcekte SOD aktivitesinin arttığı ve buna bağlı olarak yaşama oranının ve ömür uzunluğunun arttığı ortaya konulmuştur (Adamski et al. 2003). Bu çalışmada ise GST aktivitesinin artmasına rağmen ömür uzunluğunda kontrole göre önemli olmayan bir kısalma gözlenmiştir. Artan bu detoksifikasyon kapasitesinin ömür süresini uzatamamasının, yüksek MDA ve

protein karbonil miktarlarının da açıkça gösterdiği gibi oluşan biyomoleküler hasarın yüksek olmasından kaynaklanabilir. Delpuech et al. (1997), bir organofosfatlı insektisit olan klorpirifosun konukçu parazitoid iletişimde de etkili olan feromonal iletişimin etkisini incelediği çalışmalarında, bu insektisit yavaşama oranında önemli bir etki gözlemlenmemiştir. *Trichogramma brassicae* erkeklerine insektisit verildiği zaman dişi feromonlarına verdikleri cevabın önemli ölçüde azaldığını, diğer taraftan dişilere insektisit verildiği zaman erkeklerin feromona cevabının önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır.

*G. mellonella* dişilerinin terbinafin ile beslenmesi sonucu yavaşama oranı ve yumurta sayısında düşme, larval evresinde de fungal antibiyotiğe bağlı olarak besin alımının azaldığı gözlenmiştir. Buna benzer bir sonuçta, Giordano et al. (2010) tarafından antibakteriyel antibiyotik olan oksitetrasiklinin *Folsomia candida*'da vücut büyüklüğü ve yumurta sayısı üzerine olumsuz etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Açlık stresinin yumurta sayısını düşürdüğü fakat bunun yanı sıra açılma oranını etkilemediği ileri sürülmüştür (Tully and Ferriere 2008). *G. mellonella* ile yapılan bu çalışmada terbinafini yüksek konsantrasyonlarda içeren besinlerin yavaşama oranını ve yumurta verimini düşürdüğü gözlenmiştir. *Mamestra brassicae* (L.)'nin larva parazitoidi *Eulophus pennicornis* (Nees)'e diflubenzuron, hexaflumuron ve teflubenzuron'un etkileri incelenmiş, ve bu böceklerin insektisit konsantrasyonuna bağlı olarak etkilendiği, hexaflumuron, teflubenzuron ve diflubenzuron'un en düşük konsantrasyonlarında (0.5 µg ai/larva) dahi parazitoidin ergin olma oranını önemli derecede engellendiği belirlenmiştir (Butaye ve Degheele 1995). Yapılan bir başka çalışmada da beyaz sinek *Bemisia argentifolii* Bellows ve Perring'nin parazitoidleri olan *Eretmocerus tejanus* Rose ve Zolnerowich ile *Eretmocerus mundus* Mercet'un genç larvaları ile pupalarına 6 insektisit letal ve subletal etkilerini araştırılmış, 2 organik fosforlu ilaç, metil parathion ve azinfos metil kullanıldığında ergin olma oranında azalma tespit edilmiş, denenen insektisitlerin subletal dozlarının parazitoid böceklerin ömür uzunluğuna ve yumurta verimine olumsuz etki gözlenirken böceğin üremesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı etki gözlemlenmemiştir (Jones et al. 1998). Beck (1960), *G. mellonella* ile ilgili yaptığı bir çalışmada bu böceğin besinsel ihtiyaçları, ekolojik adaptasyonu ve gelişme özellikleri ile entomolojik araştırmalarda çok tercih edilen bir tür olduğunu, *G. mellonella* için hazırladığı sentetik besinde değişiklikler yaparak etkilerini incelediği çalışmasında, besine kolesterol ilavesinin larval evre sayısını azalttığını bulmuştur.

Terbinafinin bazı insan kanser hücre hatlarında mitokondri zar potansiyelini bozarak sitoplazmaya sitokrom c' nin salınmasını ve böylece apoptozu tetiklediği bilinmektedir (Yang et al. 2006). Ayrıca, 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). Terbinafinin emilimden sonra memelilerin dokularına hızla yayıldığı, eliminasyon süresinin uzun olduğu ve P450 enzimi tarafından metabolize edildiği bilinmektedir (Kirst et al. 1995). Bu çalışmada bir detoksifikasyon ve biyotransformasyon enzimi olarak GST aktivitesinin de yüksek bulunması, böceklerde bu antifungalın detoksifikasyonuna GST enziminin de katkıda bulunduğunu göstermiştir. Fungisit Propiconazole'nin gökkuşuğu alabalığın'da 7, 20 ve 30 günlük etkisinin araştırıldığı çalışmada, oksidatif stres göstergeleri ve antioksidan parametreler ölçülmüş, yedi günlük çalışmada antioksidan savunma sistemi bu etkiye adaptasyonla cevap vermiş, 20 ve 30 günlük sürelerde oksidatif stresin göstergelerinin yüksek seviyeleri ile antioksidant enzimlerde inhibisyon görülmüş, uzun süreli muamelelerin ise ciddi oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir (Li et al. 2010). Liu and 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. Ancak terbinafinin etkisini detaylı olarak belirlemek için *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında P450 ve diğer esteraz enzimlerinin aktivitelerinin de çalışılması gereklidir. P450 enzimi böceklerde hormon, asit, steroid ya da vücuda alınan pestisit gibi maddelerin anabolizması ve katabolizmasını düzenleyen önemli metabolik bir sistemdir (Feyereisen 1999). P450 enzimi böcek, bitki, kuş, bakteri ve memeliler gibi birçok organizmada bulunmaktadır. P450 sistemi içerisinde temel oksidaz işlemi gerçekleştirilmektedir. P450 enzimi ökaryotlarda P450s mitokondri ve endoplazmik retikulum'da bulunmaktadır. Böceklerde ilk toplam P450 1967 yılında belirlenmiştir (Scott 1999). Günümüze kadar 100'den fazla böcek türünde P450 monooksijenazlar bulunmuştur. Böceklerde P450 enzimi ilk kez ev sineklerinden saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Saflaştırılan böcek P450 monooksijenaz enzimi memelilerde bulunan P450 monooksijenaz ile benzerlik göstermektedir (Wilson and Hodgson 1971). Böceklerde orta barsak ve malpigi tüpleri başta olmak üzere dokuların çoğunda P450 belirlenmiştir. P450 enzim seviyesi böceklerin yaşam süreci boyunca ergin dönemlerinde yüksektir. Yumurta ve larva döneminde artan P450 seviyesi pupa döneminde azalmaktadır (Feyereisen 1999). Bazı böcek türlerinde pyrethrin, imidacloprid ve carbaryl gibi birçok insektisitinin etki mekanizmalarının kısıtlanmasında monooksijenaz seviyesinin



arttığı belirlenmiştir. Ayrıca insektisitlerin yaygın kullanılan sınıfı olan organik fosforluların etkilerinin sınırlandırılmasında da P450 detoksifikasyonunun etkili olduğu belirlenmiştir (Hollingworth and Dong 2008).

Terbinafinin konsantrasyonlara bağlı olarak yaşama oranını engellediğini ortabağırsak moleküler hasarını ve detoksifikasyon kapasitesini artırdığı gösterilmiştir. Konsantrasyona bağlı etkilerine bakıldığında terbinafin yüksek konsantrasyonlarda ergin evreye kadar olan yaşama oranını ve dişilerin yumurta verimini düşürdüğü, orta bağırsak MDA, protein karbonil miktarları ile GST aktivitesini artırdığı tespit edilmesine karşın düşük konsantrasyonlarda gelişme, eşey oranı, ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Bu veriler terbinafinin yüksek konsantrasyonlarda oksidatif biyomoleküler hasara sebep olduğunu açıkça göstermektedir. Ergosterol biyosentezine bilinen etkisi yanında, yüksek konsantrasyonlardaki terbinafinin oksidatif etkisi *G. mellonella*'nın biyolojik ve detoksifikasyon kapasitesinin zayıflamasına katkıda bulunmuş olabilir. Ancak terbinafinin hedefi olan skualen epoksidaz enzimi insanlarda da bulunmasına rağmen, fungal hücreler ile kıyaslandığında memeli hücreleri terbinafine karşı daha az hassastır (Ryder and Dupont 1985). Terbinafin fungal patojenlerde skualen epoksidaz enzimini bloke ederek ergosterol sentezini önlemektedir. Skualen epoksidaz, skualeni 2,3-oksidoskualene dönüştürür. Memelilerde önemli bir sterol olan kolesterol biyosentezinden sorumlu skualen sentaz, skualen epoksidaz, oksidoskualen lanosterol-siklaz enzimlerinin genlerinin ortoloğu böceklerde bulunmamaktadır (Rawson 2003, Astruc et al. 1977). Bu sebepten dolayı terbinafinin ya da metabolizma ara ürünlerinin böceklerde pro-oksidan etki gösterdiğini ileri sürmek daha mantıklı olacaktır. Çalışmamızda terbinafin ile beslenen son evre larvalarının orta bağırsak dokusunda lipid ve protein oksidasyonu düzeyinin yüksek bulunması bu görüşü desteklemektedir. Diğer taraftan memelilerde karaciğer enzimleri tarafından oluşturulan terbinafinin allilik aldehit metaboliti olan terbinafin-A (TBF-A)'nın karaciğer safra kanallarının zar proteinlerini değiştirmek suretiyle safra akımını azaltarak toksik etki yaptığı bilinmektedir (Iverson and Utrecht 2001). Terbinafinin biyodönüşüm metabolizma ürünleri *N*-demetilasyon, deaminasyon, alkil yan zincir oksidasyonu ve dihidrodiyol oluşumu şeklinde en az 7 adet P450 (CYP) monooksijenaz izoenzimi tarafından yürütülen dört farklı yol ile oluşur (Vickers et al. 1999). Terbinafin ya da metabolizma ürünlerinin böceğin orta bağırsak dokusunda serbest radikal oluşturarak oksidatif strese sebep olduğu detaylı çalışmalar ile kanıtlanması gerekmektedir.

## BÖLÜM 5

### SONUÇ

Doğal veya sentetik antifungal maddelerin zararlı böceklerin yaşam parametreleri ile ilişkili olarak oksidatif etkilerinin anlaşılması böceklerin çevreleri, besinleri ve konakları ile fizyolojik ve 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 antifungal antibiyotiklerin besinsel karışımlarının kullanılabilirliğinin laboratuvar şartlarında araştırılması amaçlanmıştır. Böceğin yumurta verimi ve açılıma oranı ile ilgili elde edilen veriler, bu çalışma ile hedeflenen sonuçlara ulaşıldığını göstermiştir. Ayrıca bu çalışma, zararlı böcekler ile mücadelede çevre ve hedef olmayan canlılara şu anda kullanımda olan insektisitler kadar zararlı olmayan antifungal antibiyotiklerin kullanımına yönelik bir stratejiye öncülük edilmiş olmasıdır.



## KAYNAKLAR

- Abdrashitova N F and Romanov Y A** (2001) Effects of antibiotics on reactive oxygen species generation by neutrophils. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 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. *Biol. Lett.*, 40 (1): 43-52.
- Astruc M, Tabacik C, Descomps B and Crastes de Paulet A** (1977) Squalen epoxidase and oxidosqualen lanosterol-cyclase activities in cholesterogenic and non-cholesterogenic tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 487: 204-211.
- Back D J and Tjia J F** (1991) Comparative effects of the antimycotic drugs ketoconazole, fluconazole, itraconazol and terbinafine on the metabolism of cyclosporin by human liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 32: 624-626.
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun E A and Stohs S J** (1995) In Vitro and In vivo Generation of Reactive Oxygen Species, DNA Damage and Lactate Dehydrogenase Leakage by Selected Pesticides. *Toxicology*, 104: 129-140.
- Balfour J and Faulds D** (1992) Terbinafine, A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in superficial mycoses. *Drugs*, 43: 259-284.
- Ballard J W and Melvin R G** (2007) Tetracycline treatment influences mitochondrial metabolism and mtDNA density two generations after treatment in *Drosophila*. *Insect Mol. Biol.*, 16: 799-802.
- Beck S D** (1960) Growth and Development of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Lepitoptera:Galleriidae). *Wis. Acad. Sci. Art. Lett.*, 49:137-149.
- Berlett B S and Stadtman E R** (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 272: 20313-20316.
- Bronskill J** (1961) A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepitoptera:Galleriidae). *J. Lep. Soc.*, 15: 102-104.
- Butaye L and Degheele D** (1995) Benzoylphenyl ureas effect on growth and development of *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae), a larval ectoparasite of the cabbage moth (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 88(3): 600-605.
- Büyükgüzel E** (2007) Bazı antibiyotiklerin *Galleria mellonella* L.'nın (Lepidoptera: Pyralidae) yaşama oranına, gelişme süresine ve antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 103 s.
- Büyükgüzel E and Kalender Y** (2007) Penicillin-induced oxidative stress: Effects on antioxidative response of midgut tissues in larval instars of *G. mellonella*. *J. Econ. Entomol.*, 100: 1533-1541.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Büyükgüzel E and Kalender Y** (2008) *Galleria mellonella* (L.) Survivorship, Development and Protein Content in Response to Dietary Antibiotics. *J. Entomol. Sci.*, 43(1): 27-40.
- Büyükgüzel E and Kalender Y** (2009) Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 94(2-3): 112-118.
- Büyükgüzel E, Tunaz H, Stanley D W and Büyükgüzel K** (2007) Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J. Insect Physiol.*, 53: 99-105.
- Büyükgüzel K** (2001) DNA gyrase inhibitors: Novobiocin enhances the survival of *Pimpla turionellae* larvae reared on an artificial diet but other antibiotics do not. *J. Entomol. Exp. Appl.*, 125: 583-58.
- 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.
- Büyükkoroğlu M E, Gülçin I, Oktay M and Kufrevi O I** (2001) In vitro Antioxidant Properties of Dantrolene Sodium. *Pharmacol. Res.*, 44: 491-495.
- 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). *J. Econ. Entomol.*, 83: 356-360.
- Charriere J D and Imdorf A** (1997) Protection of honeycombs from moth damage. Swiss Bee Research Center Federal Dairy Research Station. *Communication*, 24: 1-14.
- Conradt L, Corbet S A, Roper T J and Bodsworth E J** (2002) Parasitism by the mite *Trombidium brei* on four U.K. Butterfly Species. *Ecol. Entomol.*, 27, 651-659.
- Çakır Ş ve Yamanel Ş** (2005) Böceklerde İnspektisidlere Direnç. *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6(1): 21-29.
- Çömlekoğlu Ü, Mazmancı B ve Arpacı A** (2000) Pestisitlerin Kronik Etkisine Maruz Kalan Tarım İşçilerinde Karaciğer Fonksiyonlarının İncelenmesi. *Turk. J. Biol.*, 24: 461-466.
- Damien C, Chantal V H, Pirouz S, Zerimech F H, Laurence J and Jean M H** (2004) Cellular Impact of Metal Trace Elements in Terricolous lichen *Diploschistes muscorum* (Scop.) R. Sant.–Identification of Oxidative Stress Biomarkers. *Water Air Soil Pollution*, 152: 55-69.
- Delpuech J M, Gareau E, Terrier O and Fouillet P** (1997) Sublethal Effects of the Insecticide Chlorpyrifos on the Sex Pheromonal Communication of *Trichogramma brassicae*. Laboratoire de Biométrie, 30 Génétique et Biologie des Populations, CNRS umr 5558, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622, Villeurbanne Cédex, France.

**Dettbarn W D, Milatović D and Gupta R C** (2006) Oxidative Stress in Anticholinesterase-Induced Excitotoxicity. In: R.C. Gupta, Editor, Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, 511-532.

#### **KAYNAKLAR (devam ediyor)**

**Feyereisen R** (1999) Insect P450 Enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 507-33.

**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). *Env. Entomol.*, 39 (4): 1170-1177.

**Godfray H J C** (1994) Parasitoids; behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press, Princeton, NJ.

**Gokhale V M and Kulkarni V M** (1999) Comparative molecular field analysis of fungal squalene epoxidase inhibitors. *J. Med. Chem.*, 42: 5348-5358.

**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.

**Gültekin F, Delibaş N, Yaşar S and Kılınç I** (2001) In vivo Changes in Antioxidant Systems and Protective Role of Melatonin and a Combination of Vitamin C and Vitamin E on Oxidative Damage in Erythrocytes Induced by Chlorpyrifos-Ethyl in *Rat. Arch. Toxicol.*, 75: 88-96.

**Gündüz N E A ve Gülel A** (2005) Ergin yaşı ve konukçu türünün parazitoit *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae)' un gelişme süresine etkisi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(2), 31-36.

**Habig W H, Pabst M J and Jakoby W B** (1974) Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.

**Hankins E G, Gilespie J R, Aikenhead K and Buckner F S** (2005) Upregulation of sterol C14-demethylase expression in *Trypanosoma cruzi* treated with sterol biosynthesis inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 144: 68-75.

**Haynes K F** (1988) Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides on Insect Behavior. *Ann. Rev. Entomol.*, 33, 149-168.

**Hermes-Lima M and Zenteno-Savin T** (2002) Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress. *Com. Biochem. Physiol. Part C*, 133: 537-556.

**Ho P Y, Zhong W B, Ho Y S and Lee W S** (2006) Terbinafine inhibits endothelial cell migration through suppression of the Rho-mediated pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(12): 3130-3137.

**Hollingworth R M and K Dong** (2008) The Biochemical and Molecular Genetic Basis of Resistance to Pesticides in Arthropods. (Global Pesticide Resistance in Arthropods, Ed: Whaloon, M.E., Mota-Sanchez, D. And Hollingworth, R.M.), 40-90, Cromwell, UK.

**Iverson S L and Utrecht J P** (2001) Identification of a reactive metabolite of terbinafine: insights into terbinafine-induced hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 175-181.

**İçen E, Armutçu F, Büyükgüzel K and Gürel A** (2005) Biochemical stress indicators of greater wax moth *Galleria mellonella* L. exposure to organophosphorus insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 98(2): 358-366.

#### **KAYNAKLAR (devam ediyor)**

**Jain S K and Levine S N** (1995) Elevated lipid Peroxidation and vitamin E-quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 18: 337-341.

**Jones W A, Ciomperlik M A and Wolfenbarger D A** (1998) Lethal and sublethal effects of insecticides on two parasitoids attacking *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae), *Biological Control*, 11: 70-76.

**Kantarcıoğlu A S ve Yücel A** (2003) Terbinafin ile flukonazol kombinasyonunun *Candida albicans* kökenlerine in vitro etkisi. *İnfeksiyon dergisi (Turkish journal of Infection)*. 17: 71-75.

**Kirst H A, Creemer L C, Paschal J W, Preston D A, Alborn W E, 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.

**Kotnik T** (2000) Treatment with terbinafine of experimentally infected cats with *M.canis*: tolerability and side effects of the drug. *Slov. Vet. Res.*, 37: 67-86.

**Kovačić P** (2003) Mechanism of Drug and Toxic Actions of Gossypol: Focus on Reactive Oxygen Species and Electron Transfer. *Curr. Med. Chem.*, 10: 2711-2718.

**Krishmen N and Kodrik D** (2006) Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress. *J. Insect Physiol.*, 52(1): 11-20.

**Krishnan N and Sehna F** (2006) Compartmentalization of oxidative stress and antioxidant defense in the larval gut of *Spodoptera littoralis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 63: 1-10.

**Krishnan N, Kodrić D, Turanlı F and Sehna F** (2007) Stage- specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.*, 53: 67-74.

**Laing D R and Hagen K S A** (1970) Xenic, partially synthetic diet for the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Can. J. Entomol.*, 102: 250-252.

**Lee W S, Chen R J, Wang Y J, Tseng H, Jeng J H, Lin S Y, Liang Y C, Chen C H, Lin C H, Lin J K, Ho P Y, Chu J S, Ho W L, Chen L C and Ho Y S** (2003) *In vitro* and *in vivo* studies of the anticancer action of terbinafine in human cancer cell lines: G0/G1 P53-associated cell cycle arrest. *Internal. J. Cancer*, 106: 125-137.

**Lemos W P, Ramalho F S, Serrao J E and Zanuncio J C** (2003) Effects of diet on development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), a Predator of the Cotton Leafworm. *J. Appl. Entomol.*, 127: 389-395.

- Levine R L, Williams J A, Stadtman E R and Shacter E** (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*, 233: 346-357.
- Li B, Stribley J A, Ticu A, Xie W, Schopfer L M, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs S H and Lockridge O** (2000) Abundant Tissue Butyrylcholinesterase and Its Possible Function in The Acetylcholinesterase Knockout Mouse. *J. Neurochem* 75: 1320-1331.

#### **KAYNAKLAR (devam ediyor)**

- 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). *J. Econ. Entomol.*, 93(2): 234-239.
- Lowry O H, Rosebroug N I, Farr A L and Randall R J** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 19: 265.
- Mercan U** (2004) Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 15(1-2): 91-96.
- Milatoviç D, Gupta R C and Aschner M** (2006) Anticholinesterase Toxicity and Oxidative Stress. *Sci. World J.*, 6: 295-310.
- Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S and Niwa Y** (1986) Effects of antibiotics on generation of reactive oxygen species. *J. Invest. Dermatol.*, 9: 449-453.
- Ortel J** (1995) Accumulation of cd and pb in successive stages of *Galleria mellonella* and metal transfer to the pupal parasitoid *Pimpla turionellae*. *Entomol. Exp. Appl.*, 77: 89-97.
- Özkan B, Morkoç T ve Or M E** (2003) Yeni bir oral antimikotik olan terbinafinin veteriner alanda klinik kullanımı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 33: 381-383.
- Parkes T L, Hilliker A J and Phillips J P** (1993) Genetic and biochemical analysis of Glutathione S-transferase in the oxygen defense system of *Drosophila melanogaster*. *Genome*, 36: 1007-1014.
- Peric-Mataruga V, Blagojevic D, Spasic M B, Ivanovic J and Jankovic-Hladni M** (1997) Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. Caterpillars of different population origins. *J. Insect Physiol.*, 43: 101-106.
- Petranyi G, Meigassner J G and Mieth H** (1987) Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31:1365-8.
- 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. *Mech. Ageing Dev.*, 51: 283-297.
- Rawson R B** (2003) Targets of SREBPs pathway- insights from insigs and insect. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 4: 631-640.
- Reitter R J** (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB Journal*, 9: 526-533.
- Ryder N S** (1992) Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br. J. Dermatol.*, 126 (39): 2-7.



- Ryder N S and Dupont M C** (1985) Inhibition of squalene epoxidase by allylamine antimycotic compounds: a comparative study of the fungal and mammalian enzymes. *Biochem J.*, 230: 765-770.
- Ryder N S and Favre B** (1997) Antifungal activity and mechanism of action of terbinafine. *Reviews in Contemporary Pharmacotherapy*, 8: 275-386.

#### **KAYNAKLAR (devam ediyor)**

- Scott J G** (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol. Biol.*, 29: 757-777.
- 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.
- Serafini M and Del Rio D** (2004) Understanding the Association Between Dietary Antioxidants, Redox Status and Disease: Is the Total Antioxidant Capacity the Right Tool?. *Redox Rep.*, 9(3): 145-152.
- Shacter E** (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Met. Rev.*, 32:307-326.
- Singh P and House H L** (1970) Antimicrobials safe levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. *J. Insect Physiol.*, 16: 1769-1782.
- Snedecor G W and Cochran W G** (1967) *Statistical methods* 6<sup>th</sup> ed. Ames, USA, Iowa State Univ. Press.
- Sohal R S, Agarwal S and Sohal B H** (1995) Oxidative stress and aging in the Mongolian Gerbil. *Mech. Ageing Dev.*, 81: 15-25.
- Song O** (2004) Oxidative Stress: A Theoretical Model or Biological Reality?. *Comptes Rendus Biologies*, 327: 649-662.
- SPSS** (1997) User's manual, version 10. SPSS, Chicago, IL.
- Stadtman E R and Levine R L** (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25: 207-218.
- Sun J, Folk D, Bradley T J and Tower J** (2002) Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life Span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 161: 661-672.
- Terra W R, 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.
- Tribble D L, Aw T Y and Jones D P** (1987) The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology*, 7(2): 377-387.
- Tully T and Ferriere R** (2008) Reproductive flexibility: genetic variation, genetic costs and long-term evolution in a collembola. *PLoS One*, 3: 3207.
- Vickers A E M, Sinclair J R, Zollinger M, Heitz F, Glänzel U, Johanson L and Fischer V** (1999) Multiple Cytochrome P450s Involved in the Metabolism of Terbinafine Suggest a Limited Potential for Drug-Drug Interactions. *Drug Metab. Dispos.*, 27: 1029-1038.

- Vijayalekshmy K S, Menon V P and Leelamma S** (1992) Role of antibiotics in lipid peroxidation. *Indian J. Biochem Biophys.*, 29: 371-374.
- Wilson T G and E Hodgson** (1971) Microsomal NADPH-Cytochrome C ReductasemFrom The Housefly, *Musca Domestica*, Properties of The Purified Enzyme. *Insect Biochem.*, 1: 19-26.

**KAYNAKLAR (devam ediyor)**

- Yang K C, Wu C C, Wu C H, Chen J H, Chu C H, Chen C H, Chou Y H, Wang Y J, Lee W S, Tseng H, Lin S Y, Lee C H and Ho Y S** (2006). Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in terbinafine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in HL60 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 44: 214-226.
- Zakai H A and Zimmo S K** (2000) Effects of itraconazole and terbinafine on *Leishmania major* lesions in BALB/c mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 94: 787-791.
- Zalucki M P, Clarke A R and Malcolm S B** (2002) Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. *Annu Rev. Entomol.*, 47: 361-393.



## **ÖZGEÇMİŞ**

Suzan KASTAMONULUOĞLU 1983'te Zonguldak da doğdu; İlk ve orta öğrenimini aynı ilde tamamladı. Uzun Mehmet Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2001 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girdi; 2005 yılında Mersin Üniversitesinden mezun oldu. 2009 yılında girdiği ZKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programını sürdürmektedir.

### **ADRES BİLGİLERİ:**

Adres: Çınartepe mah. Baruthane sok. No:36 Merkez / ZONGULDAK

Tel : (372) 268 10 78

E-posta: suzankk@hotmail.com