



## Antibakteriyel Etkiye Sahip Penisilin G'nin *Drosophila melanogaster*'in Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkisi

### *Effect of Antibacterial Penicillin G on Antioxidant Defense System of Drosophila melanogaster*

Utku Can Atılğan<sup>1\*</sup> , Ender Büyükgüzel<sup>2</sup> 

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Zonguldak

#### Öz

Tarım ürünlerinin verimini etkileyen zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak veya zararlarını azaltmak için çeşitli pestisitler kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddelerin kontrolsüz ve aşırı kullanımları hem çevre hem de bütün canlılar için tehlike oluşturmaktadır. Zararlı böcekler ile mücadelede kullanılan kimyasal maddelerin hem etkinliğinin hem de canlı üzerindeki fizyolojik etkilerinin iyi bilinmesi gereklidir. Bunun için laboratuvar koşullarında model organizmalar üzerinde bu maddelerin denenmesi oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmada model organizma olarak *Drosophila melanogaster* kullanılmış olup, insektisitlere alternatif bir madde olarak antibakteriyel bir etkiye sahip penisilin G'nin böcek üzerinde oksidatif etkisi ve antioksidan kapasitesindeki değişimler incelenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında en düşük denenen konsantrasyon olan 100 mg/L penisilin G içeren besin, böceğin 3. evre larvasında, malondialdehit (MDA) miktarını  $8,39 \pm 2,65$  nmol/mg proteinden  $18,92 \pm 3,22$  nmol/mg proteine istatistiksel olarak önemli derecede artırdığı tespit edildi. 400 mg/L'lik besinde 3. evre larvalarında protein karbonil miktarı (PCO)  $1539,69 \pm 286,45$  nmol/mg protein'e yükseldiği tespit edilmiş ve istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında larval evredeki glutatyon-s-transferaz (GST) aktivitesinin 100 mg/L'de istatistiksel olarak önemli bir artış tespit edildi. Böceğin pup ve ergin evresinde 400 mg/L bulunduran besin grubunda, katalaz (CAT) aktivitesi sırasıyla  $547,58 \pm 55,56$   $\mu\text{mol/mg protein/dk}$ ,  $242,24 \pm 42,85$   $\mu\text{mol/mg protein/dk}$  olarak tespit edilmiş olup, bu sonuç kontrol ile karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek bulundu. Pup evresindeki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi en düşük penisilin miktarında (100 mg/L) istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. 400 mg/L'de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında pup evresinde glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi yaklaşık iki katı oranında arttığı tespit edildi. Elde edilen sonuçlar ile Penisilin G'nin böceğin farklı evrelerindeki antioksidan enzimler üzerinde ve oksidatif stres belirteçlerinde önemli değişimlere sebep olduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Drosophila melanogaster*, Malondialdehit, Protein karbonil, Katalaz, Süperoksit dismutaz, Glutayon peroksidaz, Penisilin G

#### Abstract

Various pesticides are used to prevent, control or reduce harmful organisms that affect the yield of agricultural products. The uncontrolled and excessive use of these chemical substances poses a danger to both the environment and all living things. It is necessary to know both the effectiveness of the chemicals and their physiological effects on the living organism used in the management against to harmful insects. For this, it is very important to test these substances on model organisms in laboratory conditions. In this study, *Drosophila melanogaster* was used as a model organism, and the oxidative effect of penicillin G, which has an antibacterial effect as an alternative to insecticides, on the insect and changes in antioxidant capacity were investigated. 100 mg/L of penicillin G concentration compared to the control, statistically significantly increased the malondialdehyde (MDA) content from  $8.39 \pm 2.65$  nmol/mg protein to  $18.92 \pm 3.22$  nmol/mg protein in the 3rd stage larva of the insect. It was determined that the amount of protein carbonyl (PCO) in the 3rd stage larvae increased to  $1539.69 \pm 286.45$  nmol/mg protein in 400 mg/L diet and it was statistically significant. Compared with the control group, a statistically significant increase in Glutathione S-transferase (GST) activity in the larval stage was detected at 100 mg/L. 400 mg/L of penicillin G concentration in the pupa and adult stages of the insect, the catalase (CAT) activity was determined as  $547.58 \pm 55.56$   $\mu\text{mol/mg protein/min}$ ,  $242.24 \pm 42.85$   $\mu\text{mol/mg protein/min}$ , respectively. was significantly higher compared to the control. A statistically significant increase was observed in the lowest amount of penicillin G (100 mg/L) in the SOD activity in the

\*Sorumlu yazarın e-posta adresi: [utkucanatilgan@gmail.com](mailto:utkucanatilgan@gmail.com)

Utku Can Atılğan  [orcid.org/0000-0003-4167-1540](https://orcid.org/0000-0003-4167-1540)

Ender Büyükgüzel  [orcid.org/0000-0002-4442-5081](https://orcid.org/0000-0002-4442-5081)

pup stage. Compared to the control group at 400 mg/L, glutathione peroxidase (GPx) activity was found to increase approximately twice in the pup stage. With the results obtained, it was determined that Penicillin G caused significant changes on antioxidant enzymes and oxidative stress markers in different stages of the insect.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, Malondialdehyde, Protein carbonyl, Catalase, Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, Penicillin G

## 1. Giriş

Zararlılarla mücadelede farklı etki mekanizmasına sahip çeşitli pestisitler kullanılmaktadır. Dünya genelinde kontrollü olmayan ve aşırı miktarda kullanılan pestisitler hedef olmayan canlılar ve ekosistem için büyük tehlike oluşturmaktadır (Dey 2016, Catae 2019, He vd. 2021). Son yıllarda geleneksel olarak kullanılan kimyasalların yanı sıra daha az toksik etkiye sahip maddeler tercih edilmektedir. Bunun sebebi hedef olmayan canlılar üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak içindir. Bu kimyasalların hedef olmayan canlılar üzerindeki etkilerinin anlaşılması ve alternatif kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir (Güneş ve Büyükgüzel 2017, Doğan 2019). *Drosophila melanogaster*, ülkemizde özellikle Ege bölgesinin incir bahçelerinde tarım zararlısı olarak tespit edilen *Drosophila* türlerinden biridir. Meyvelerin kurtlanmasına, çürümmesine ve kalitesinin düşmesine neden olmaktadır (Akşit vd. 2003). Ayrıca, yaşam döngüsünün kısa olması, kültürünün kolay ve ucuz olması, genomunun dizilenmiş olması ve etik kısıtlamalar olmaması nedeni ile *D. melanogaster* laboratuvarlarda uzun süredir kullanılan önemli bir model organizmadır (Parvathi vd. 2009). Son 10 yıl içerisinde toksikoloji çalışmalarında ağırlıklı olarak tercih edilen ve önemli çıkarımlar yapılmasına imkan tanıyan bir organizma olarak da görülmektedir (Hirsch 2012, Abolaji vd. 2013). Yaygın kullanıma sahip insektisitlerin yerine alternatif kimyasalların laboratuvar ortamında zararlı böcekler üzerindeki etkilerinin gösterildiği model organizmalar ile yapılan birçok çalışmanın yapıldığı görülmektedir (Büyükgüzel 2007, Büyükgüzel ve Kalender 2009). Bu maddelerin bir grubu antibiyotik yapıda olan insektisitler grubunda da yer almaktadır; örnek olarak abamektin ve streptomisin verilebilir (Büyükgüzel ve Kalender 2007, Büyükgüzel ve Kalender 2009, Keleş vd. 2021). Antibiyotikler ayrıca laboratuvar şartlarında model olarak kullanılan böceklerin yapay besinlerinde mikrobiyal kontaminasyonu engellemek amacıyla da eklenmektedir. Böcekler laboratuvar koşullarında kültüre alınırken özellikle yapay besinin kalitesini arttırmak için birçok antimikrobiyal etkiye sahip madde kullanılmaktadır (Pascacio-Villafán vd. 2017, van der Fels-Klerx vd. 2018, Cohen 2018, Aslan

vd. 2019, Ustundag vd. 2019). Belirli konsantrasyonlarda yapay besinlere eklenen antibiyotiklerin böceklerin yaşama, gelişime, ömür uzunlukları, yumurta verimi gibi birçok parametresi üzerinde etkili olduğu farklı böcek türlerinde gözlenmiştir (Büyükgüzel ve Yazgan 2002, Dent ve Binks 2020).

Yapay besin ortamlarına ilave edilen antimikrobiyal özellikteki maddelerin böceğin sadece biyolojik özelliklerine değil aynı zamanda böceğin fizyolojik döngüsü üzerinde olumsuz etki yaptığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Çelik vd. 2019, Ustundag vd. 2019, Aslan vd. 2019, Kastamonuluoğlu vd. 2020). Aynı zamanda bu çalışmalarda yapay besin kalitesini arttırmak için kullanılan bu maddelerin böcek üzerinde oksidatif stres yaratmış olabileceği de vurgulanmaktadır. Bilindiği gibi oksidatif stres sonucu birçok dokuda serbest radikal oluşumu meydana gelebilmektedir. Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron çifti içeren atom veya moleküller olup, biyolojik sistemlerde farklı yollarla üretilirler (Lushchak 2014). Serbest radikaller ile antioksidanlar arasında bulunan denge, fizyolojik fonksiyonların uygun şekilde yürüyebilmesi için çok önemlidir (Huynh vd. 2017, Nair vd. 2018). Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması halinde oksidatif stres meydana gelir (Halliwell ve Gutteridge 2015). Ayrıca, vücuda dışarıdan alınan kimyasal ajanlar (pestisitler, ağır metaller vb.), biyolojik ajanlar (bakteri, mantar, parazit vb.), fiziksel ajanlar (radyasyon, sıcaklık vb.) ve çevresel stres (su kirliliği, mevsimsel değişimler vb.) faktörleri oksidatif stresi tetiklemektedirler (Valko 2007, Halliwell ve Gutteridge 2015). Bu durumlarda biyomoleküller üzerine hasar oluşturabilmektedir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için diğer ökaryotik organizmalar gibi böceklerde de antioksidan enzimatik savunma sistemi vardır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST), sitokrom P450, böceklerdeki antioksidan enzimlerdir (Wu ve Yi 2015, Güneş ve Büyükgüzel 2017). Böceklerde bunların dışında GST izoformlarının (GSTpx), Thioredoksin (TRX), Glutaredoksin (GRX) gibi antioksidan enzimlerde bulunmaktadır (Bauer vd. 2002, Corona ve Robinson 2006, Yao vd. 2014).

Penisilin G, antibakteriyel aktiviteye sahip, bakteri hücre duvarının içinde bulunan penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP'ler) bağlanır bakteri hücre duvarı kuvveti ve sertliği için gerekli olan peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlantısına üzerinde etki göstererek bakteri hücre duvarı sentezini kesintiye uğratar ve bakteri hücre duvarının zayıflamasına ve sonuçta hücre lizisine neden olmasını sağlar (Büyükgüzel ve Kalender 2007). 2020 yılında Üstündağ vd. tarafından geniş spektrumlu, beta-laktam özellikteki penisilin laboratuvar koşullarında yapay besin ortamına ilave edilerek *D. melanogaster*'in tüm yaşama ve gelişme parametreleri incelenmiş ve konsantrasyonlara bağlı olarak böceğin biyolojik özellikleri üzerinde olumsuz etki yaptığı tespit edilmiştir. Ancak yapay besin ortamına farklı penisilin miktarlarının eklenerek elde edilen *D. melanogaster*'in larva, pup, ergin bireylerinde antioksidan enzimatik savunma sisteminden sorumlu enzimlerden SOD, CAT, GPx, GST enzim aktiviteleri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışma ile denenen etken maddenin *D. melanogaster* üzerindeki oksidatif etkisi ve böceğin larva, pup, ergin bireylerindeki antioksidan enzim kapasiteleri hakkında bilgiler sunulmaktadır. Ayrıca çalışmamız 2020 Üstündağ vd. tarafından yapılan ve bu etken maddenin *D. melanogaster*'in tüm yaşama ve gelişme parametreleri üzerinde olumsuz etkisinin gösterildiği çalışmayı da destekleyen sonuçlar elde edilmiş olması bu alandaki çalışmalara önemli katkı sağlayacak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

## 2. Gereç ve Yöntem

### 1.1. Stok Kültürün Oluşturulması

Çalışmada kullanılan *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae)'in W1118 soyu kullanıldı. Stok kültür, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Böcek Kültürü Laboratuvarında 25 ± 2 °C sıcaklık, %60-70 bağıl nem ve 12 saatlik fotoperiyot şartlarında yapay besin (Rogina vd. 2000, Lesch vd. 2007) kullanılarak devamlılığı sağlandı. Yapay besin içeriği: agar-agar (Ultrapure), D-Sükroz (SigmaUltra, ≥ % 99, Sigma-Aldrich), kuru toz maya (Dr. Oetker Gıda San. ve Tic. A.Ş., Torbalı- İzmir), L-Askorbik asit (Sigma Ultra, ≥ % 99), etanolde (ACS reagent, ≥ %99,5), %13,5'lik nipajin (p-hidroksibenzoik asit metil ester, kristal) çözeltisinden, patates püresi (Knorr, Unilever Sanayi ve Ticaret Türk A.Ş. Ümraniye, İstanbul) ve saf su'dan oluşmaktadır.

### 1.2. Belirlenen konsantrasyonlarda Penisilin G Uygulanması

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalar

sonucunda Penisilin G konsantrasyonları 100, 200, 400, 800 mg/L olarak belirlendi ve deney düzeneğimizde bu konsantrasyonlar kullanıldı. Penisilin G suda çözünebilen bir madde olduğu için yapay besin ortamına direk olarak eklenmiştir. Belirlenen her penisilin konsantrasyonu için yapay besin üzerine 2-3 dişi ve erkek birey bırakıldı ve 250 ml lik kültür şişeleri kullanıldı. Dişi bireyler bu besin üzerine yumurtalarını bıraktı ve yumurtaların açılması için beklendi. Açılan yumurtalardan elde edilen larvalar, pup, ergin örnekleri toplandı.

### 1.3. Örnek Toplanması

Kontrol ve deney gruplarının bulunduğu kültür şişeleri deneyin başlatılmasından sonra gelişme evreleri takip edildi ve 3. evre larvaların besin üzerinde görülmesinin ardından erginler kültürden uzaklaştırılmış ve örnek toplama işlemine geçildi. Larva, pup ve ergin bireylerden her tekrar için 30 birey sayısına ulaşılan kadar örnekler toplanmış ve -80 °C'de analiz yapılana kadar muhafaza edilmek üzere dondurucuya kaldırıldı.

### 1.4. Oksidatif stres belirteçlerinden Malondialdehit (MDA) ve Protein karbonil (PCO) Miktarlarının Belirlenmesi

MDA: *D. melanogaster*'in olgun larva (3. evre), pup ve ergin evrelerindeki tüm vücut dokularını parçalama işlemi için %1,15'lik KCl kullanılarak ultrasonik homojenizatörden geçirildi (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus, HD2070, Berlin, Germany). Jain ve Levine 1995 metoduna göre tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren lipid peroksidasyonun son ürünü MDA spektrofotometrede 532 nm'deki absorbanı okunarak miktarı hesaplandı. MDA miktarı  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak verildi.

PCO: Protein karbonil tayini Levine vd. (1994)'in metodu temel alınıp bir ölçüde değiştirilerek (Krishnan ve Kodrik 2006) kuvvetli asit ortamda (2M HCl) proteindeki karbonil gruplarının 2,4 dinitrofenil hidrazin (DNPH) ile kararlı bir 2,4 dinitrofenil (DNP) hidrozon oluşturması ve bu ürünlerin 370 nm'de absorbanlarının ölçülmesi esasına dayanarak yapıldı. Ayrıca protein oksidasyonu sonucunda meydana gelen PCO miktarının hesaplanması için total protein tayini yapıldı. 6M guanidin hidroklorür ile çözülen homojen karışımdan alınan 150 µl'ye 1350 µl guanidin hidroklorür ilave edilerek 1:10 oranında sulandırıldı. Örneklerin absorbanları 280 nm'de spektrofotometrede ölçüldü (Pajot 1976).

### 1.5. Antioksidan Enzim Analizleri

*Drosophila melanogaster*'in olgun larva (3. evre), pup ve ergin evrelerindeki tüm vücut dokularının ekstrasyonu homojenizasyon tamponu (% 1,15'lik KCl (Potasyum klorür), 25 mM  $K_2HPO_4$  (Potasyum hidrojen fosfat), 5 mM EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit), 2 mM PMSF (Fenilmetilsülfonil florid), 2 mM DTT (Ditiyotiretol), pH: 7,4) içerisinde ultrasonik homojenizatör (Bandelin Sonoplus, HD2070, Berlin, Germany) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen homojenat ikiye ayrıldı, ilk grup SOD ve CAT tayini için ikinci grup ise GST ve GPx tayini için kullanılmak üzere santrifüjleme işlemine tabi tutuldu.

**SOD:** Toplam SOD (EC 1.15.1.1) tayininde Marklund ve Marklund (1974)'un metodu kullanılarak pyrogallol'un 3 dakikada 440 nm'de alkali ortamda otooksidasyonu ile yükselen absorbans ölçüldü. Enzim aktivitesi U/mg protein olarak hesaplandı.

**CAT:** Katalaz (EC 1.11.1.6) enziminin aktivite tayini Aebi (1984) tarafından belirtilen metot ile yapılarak, enzim aktivitesi  $\mu\text{mol/mg protein/dk}$  olarak verildi.

**GPx:** Glutasyon peroksidaz (EC 1.11.1.9) tayini Paglia ve Valentine (1967) tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. Bu metod okside glutasyon (GS-SG) ve NADPH'ı substrat olarak kullanan glutasyon redüktazın 340 nm'de Nikotinamidadenin-dinükleotid hidrojen fosfat (NADPH)'ı okside etmesi ile meydana gelen azalan absorbansın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Enziminin spesifik aktivitesi  $\text{nmol/mg protein/dk}$  olarak verildi.

**GST:** Glutasyon-S-transferaz (EC 2.5.1.18) Habig vd. (1974) tarafından geliştirilen metod kullanılarak GST (EC 2.5.1.18) aktivitesi ölçüldü. Enzim aktivitesi 340 nm'de ( $\epsilon_{340}$ :  $0,0096 \mu\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) süpernatantta bulunan 1 mg toplam protein başına 1 dakikada oluşturulan tioether miktarı olarak ölçüldü. Enzimin spesifik aktivitesi ise  $\text{mmol/mg protein/dk}$ 'dır.

**Total Protein Tayini:** Folin-Lowry vd. 1951 metoduna göre lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarlarını ve antioksidan enzimlerin (GST, CAT, GPx ve SOD) aktivitesini  $\text{mg protein başına}$  hesaplamak için örnek özütlerden total protein tayini deneyi yapıldı. Örneklerin absorbansları 600 nm'de ölçüldü. Örneklerdeki protein tayini için farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltileri hazırlanarak standart grafik elde edildi. Elde edilen bu standart grafikten toplam protein miktarları hesaplandı.

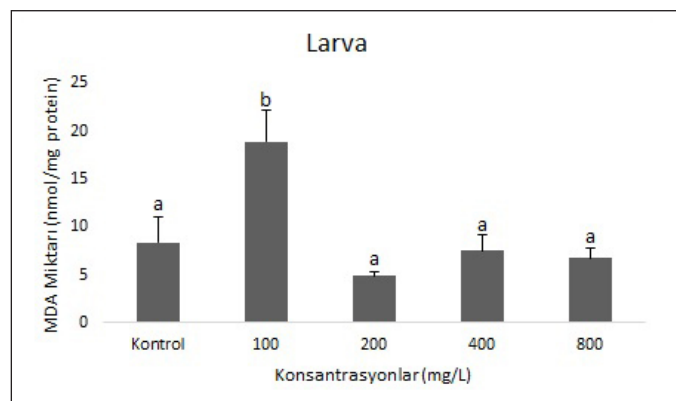
### 1.6. Verilerin Değerlendirilmesi

MDA ve PCO miktarları, antioksidan enzim aktiviteleri (GST, CAT, GPx ve SOD) ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü "Varyans Analizi" (ANOVA) (IBM SPSS 2021, versiyon 28.0), ortalamalar arasındaki farkın önemini saptamak için "LSD Testi" (IBM SPSS 2021, versiyon 28.0) uygulandı. 0,05 olasılık düzeyinde ortalamaların önemi belirlendi.

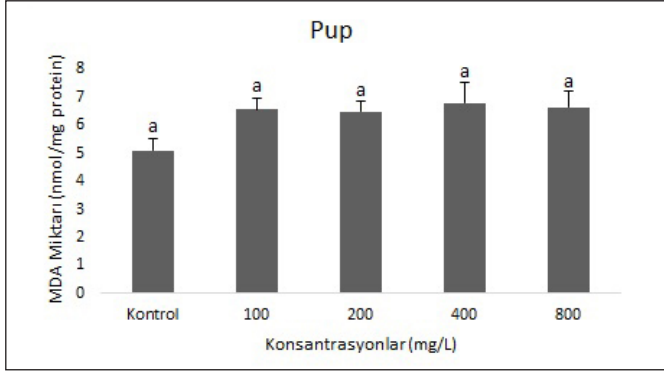
## 2. Bulgular

Kontrol ile karşılaştırıldığında en düşük denenen konsantrasyon olan 100 mg/L penisilin içeren besin, böceğin 3. evre larvasında, malondialdehit (MDA) miktarını  $8,39 \pm 2,65 \text{ nmol/mg protein}$ den  $18,92 \pm 3,22 \text{ nmol/mg protein}$ e istatistiksel olarak önemli derecede artırdığı tespit edildi (Şekil 1). Pup ve ergin evrelerdeki denenen tüm penisilin konsantrasyonlarda MDA miktarları kontrol besinine göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi (Şekil 2, 3).

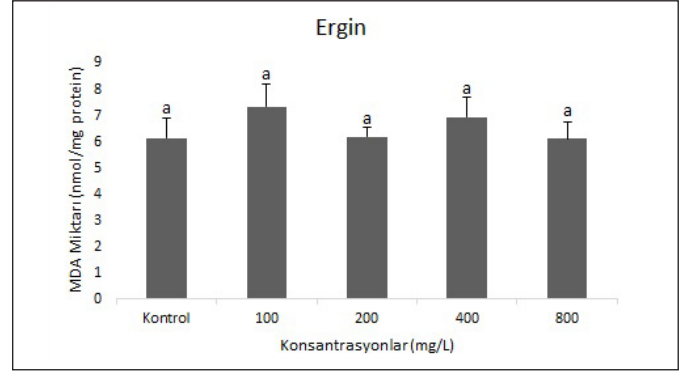
3. evre larvalarında kontrol grubunda protein karbonil (PCO) miktarı  $500,85 \pm 205,26 \text{ nmol/mg protein}$  elde edilmiş olup bu değer 400 mg/L'lik besinde larvada  $1539,69 \pm 286,45 \text{ nmol/mg protein}$ 'e yükseldiği tespit edildi ve istatistiksel olarak önemli çıktı (Şekil 4). Pup evresinde 100, 200 ve 400 mg/L penisilin konsantrasyonlarında sırası ile  $222,02 \pm 56,67 \text{ nmol/mg protein}$ ,  $272,88 \pm 93,20 \text{ nmol/mg protein}$  ve  $335,62 \pm 70,45 \text{ nmol/mg protein}$ 'e düştüğü görülmüş ve istatistiksel olarak da anlamlı olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 5). Ergin evre sadece 400 mg/L penisilin PCO miktarını önemli derecede arttırmıştır (Şekil 6).



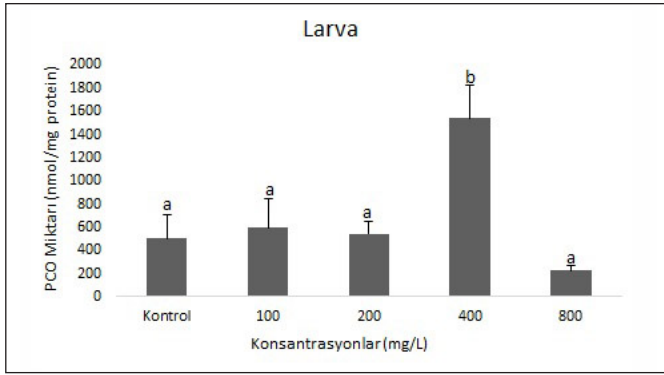
**Şekil 1:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in larva evresindeki lipid peroksidasyon ürünü MDA miktarına etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet 3. evre larva kullanılarak dört defa tekrar edildi.



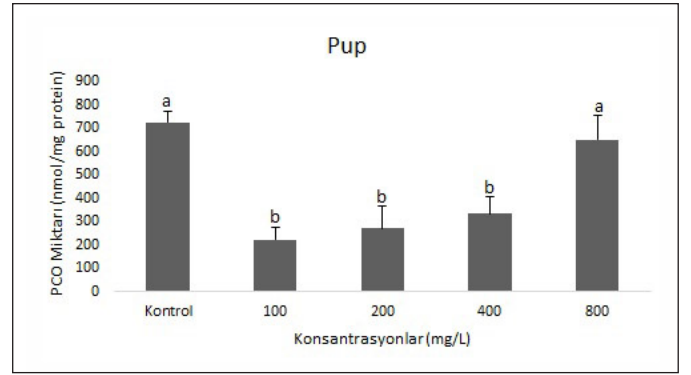
**Şekil 2:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in pup evresindeki lipid peroksidasyon ürünü MDA miktarına etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet pup kullanılarak dört defa tekrar edildi.



**Şekil 3:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in ergin evresindeki lipid peroksidasyon ürünü MDA miktarına etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet ergin kullanılarak dört defa tekrar edildi.



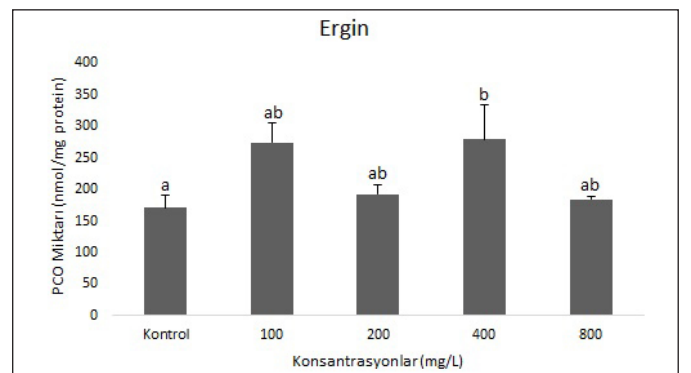
**Şekil 4:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in larva evresindeki protein oksidasyonu sonucu oluşan PCO miktarına etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet 3. evre larva kullanılarak dört defa tekrar edildi.



**Şekil 5:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in pup evresindeki protein oksidasyonu sonucu oluşan PCO miktarına etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet pup kullanılarak dört defa tekrar edildi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında larval evredeki glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesinin 100 mg/L'de istatistiksel olarak önemli bir artış tespit edildi (Şekil 7). Penisilin'in tüm konsantrasyonlarının pup evresinde GST aktivitesinde artışa sebep olduğu görüldü; ancak bu artışın 100 mg/L'de anlamlı olduğu, 200, 400 ve 800 mg/L penisilin miktarlarında anlamlı olmadığı tespit edildi (Şekil 8). Ergin evrede GST aktivitesinde önemli bir fark oluşmamıştır (Şekil 9).

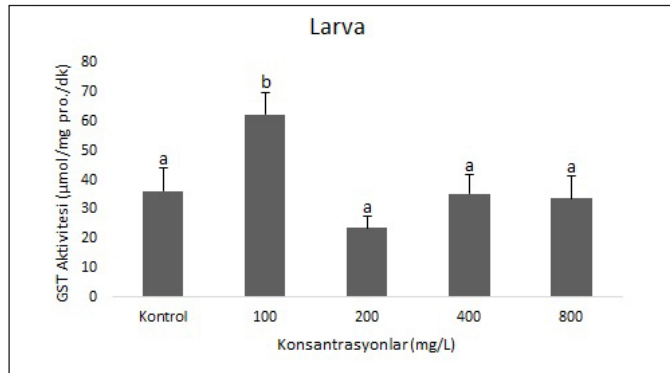
Penisilin içermeyen kontrol grubunda katalaz (CAT) aktivitesi  $775,39 \pm 56,37$   $\mu\text{mol/mg protein/dk}$ 'dır. 100, 200, 400 ve 800 mg/L penisilin içeren besin grubu kontrol besinine göre CAT aktivitesinde, önemli bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi (Şekil 10). Bu sonucun aksine pup ve ergin evresinde 400 mg/L bulduran besin grubunda,



**Şekil 6:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in ergin evresindeki protein oksidasyonu sonucu oluşan PCO miktarına etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet ergin kullanılarak dört defa tekrar edildi.

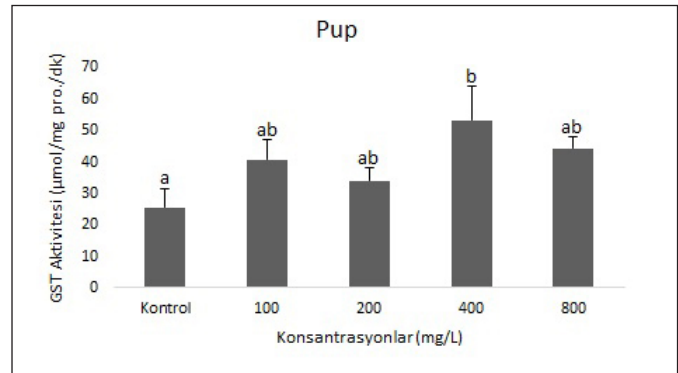
CAT aktivitesi sırasıyla  $547,58 \pm 55,56$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein/dk,  $242,24 \pm 42,85$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein/dk olarak tespit edilmiş olup, bu sonuç kontrol ile karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek bulundu (Şekil 11, 12).

Larval evrede süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 13). Pupa evresindeki SOD aktivitesi kontrol besin grubunda  $0,69 \pm 0,019$  U/mg protein'dir. Aynı evrenin en düşük penisilin miktarında (100 mg/L) istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 14). En yüksek penisilin konsantrasyonu olan 800 mg/L kontrol besini ile karşılaştırıldığında pupa evresinde SOD aktivitesinde istatistiki açıdan önemli bir azalma tespit edildi. Ergin bireylerde ise 100 ve 400 mg/L penisilin içeren besin grubu ile kontrol besini karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde istatistiki açıdan önemli bir azalma tespit edilmiştir (15).

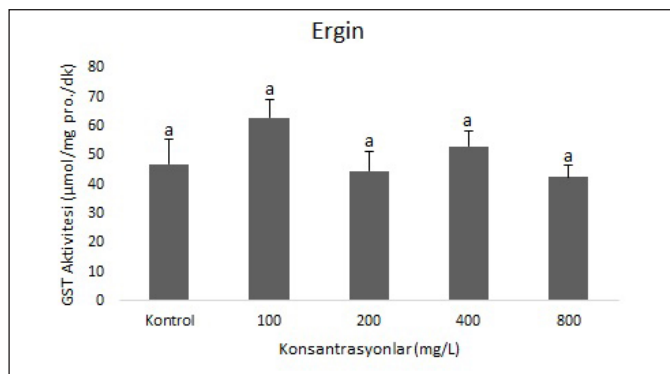


**Şekil 7:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in larva evresindeki GST aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet 3. evre larva kullanılarak dört defa tekrar edildi.

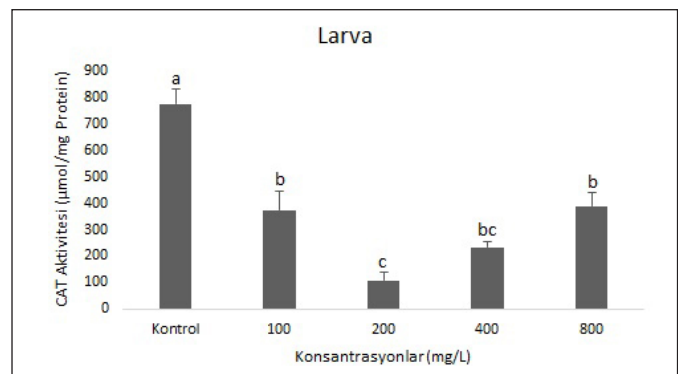
Yapay besindeki 100, 400 ve 800 mg/L penisilin konsantrasyonlarında böceğin larval evresindeki GPx aktivitesini düşürmüştür. En fazla azalma  $0,003 \pm 0,0008$  nmol/mg protein/dk enzim aktivitesi olarak tespit edilen en yüksek penisilin konsantrasyonunu (800 mg/L) içeren besinde gerçekleşti ve bu sonuç istatistiki açıdan önemlidir (Şekil 16). Denenen 200 mg/L penisilin konsantrasyonu kontrol besinine göre pupa evresinde GPx aktivitesini istatistiki açıdan önemli bir azalmaya neden oldu. Ancak bu azalma 400 mg/L'de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yaklaşık iki katı oranında arttığı tespit edildi (Şekil 17). Ergin evredeki GPx aktivitesi yalnızca 100 mg/L penisilin konsantrasyonu tarafından artırılmış olup diğer konsantrasyonlar etkili olmamıştır (Şekil 18).



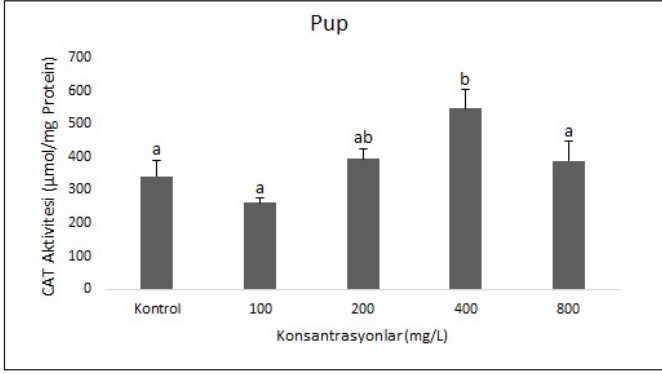
**Şekil 8:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in pupa evresindeki GST aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet pupa kullanılarak dört defa tekrar edildi.



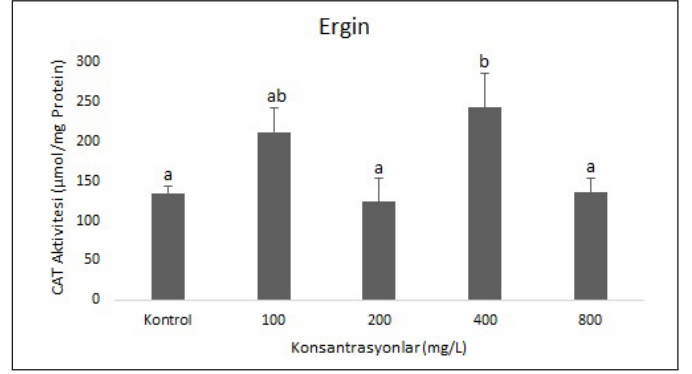
**Şekil 9:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in ergin evresindeki GST aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet ergin kullanılarak dört defa tekrar edildi.



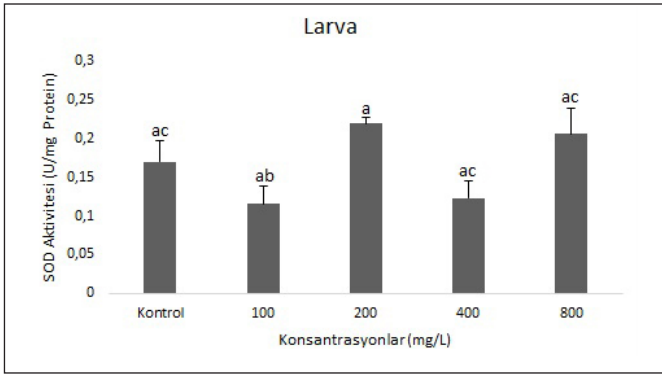
**Şekil 10:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in larva evresindeki CAT aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet 3. evre larva kullanılarak dört defa tekrar edildi.



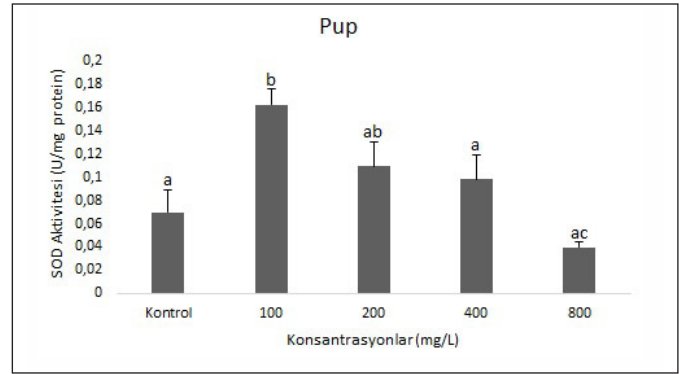
**Şekil 11:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in pup evresindeki CAT aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet pup kullanılarak dört defa tekrar edildi.



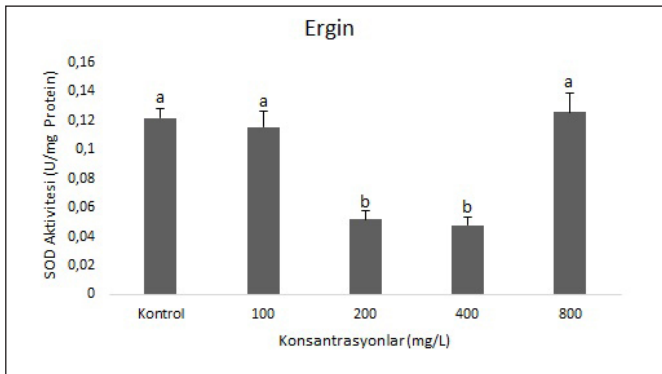
**Şekil 12:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in ergin evresindeki CAT aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet ergin kullanılarak dört defa tekrar edildi.



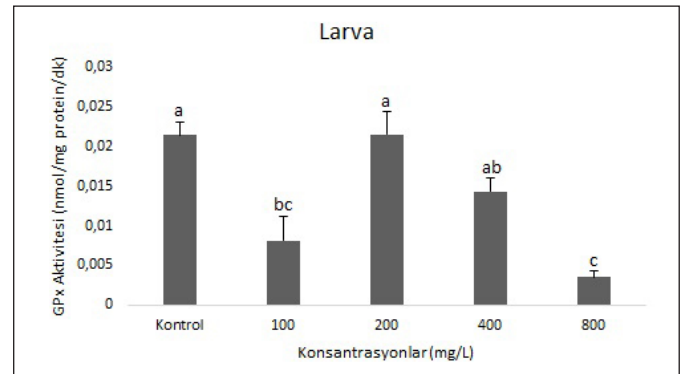
**Şekil 13:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in larva evresindeki SOD aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet 3. evre larva kullanılarak dört defa tekrar edildi.



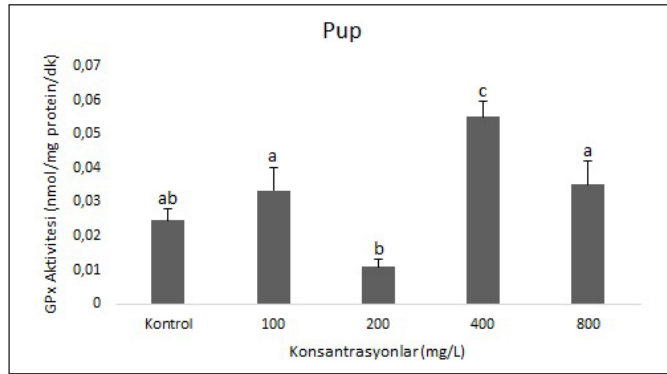
**Şekil 14:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in pup evresindeki SOD aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet pup kullanılarak dört defa tekrar edildi.



**Şekil 15:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in ergin evresindeki SOD aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet ergin kullanılarak dört defa tekrar edildi.



**Şekil 16:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in larva evresindeki GPx aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet 3. evre larva kullanılarak dört defa tekrar edildi.

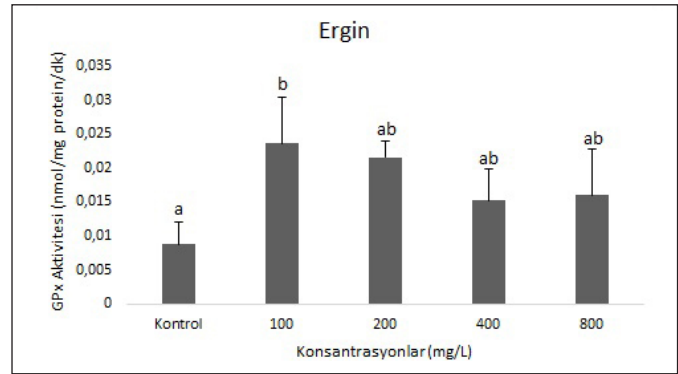


**Şekil 17:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in pup evresindeki GPx aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet pup kullanılarak dört defa tekrar edildi.

#### 4. Tartışma

Pesitisit kullanımının getirdiği olumsuz sonuçların önlenmesi ve sürdürülebilir mücadele yöntemlerinin bulunması amacıyla yeni yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda zararlı böcekler ile kimyasal mücadele çalışmalarında farklı etki mekanizmasına sahip antimikrobiyal ajanların böceklerin üzerindeki biyolojik ve kimyasal etkileri incelenmektedir (Büyükgüzel and Kalender 2008, Büyükgüzel 2009). Antibakteriyel etkiye sahip Penisilin G'nin model organizma *Drosophila melanogaster*'in larva, pup ve ergin evrelerindeki oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemi üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Oksidatif stres belirteçleri olan MDA ve PCO miktarları, larva ve ergin evrelerinde artan konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak artış göstermiştir. Bu durum, etken maddeye bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin oluşması sonucu oksidatif hasarın meydana gelmesi ve antioksidan savunma sistemine olumsuz etki oluşturması sebebiyle gerçekleşmiş olabilir. *D. melanogaster*'in larva evresinde 100 mg/L konsantrasyonunda MDA miktarındaki artış ile GST aktivitesindeki artışın korelasyon göstermesi literatürde bulunan diğer çalışmalarda da benzer şekilde görülmektedir (Hyrsıl et al. 2007, Büyükgüzel and Kalender 2007, Aslan et al. 2019). Bilindiği gibi; GST, faz II detoksifikasyonunda görevli temel bir enzimdir; lipid peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonu ve reaktif türlerin konjugasyonu ile oksidatif hasarı önler (Matés 2000, Valko et al. 2007, Halliwell and Gutteridge 2015, Anet et al. 2019). Elde edilen bulgular doğrultusunda larva ile yapılan çalışmalarda MDA miktarındaki artışın, penisiline bağlı reaktif oksijen türleri (ROS) miktarındaki artıştan kaynaklı olabileceği ve



**Şekil 18:** Penisilin'in *D. melanogaster*'in ergin evresindeki GPx aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfi içeren çubukların gösterdiği ortalamalar birbirinden farklı değildir ( $p>0,05$ ). Deneyler her tekrarda 30 adet ergin kullanılarak dört defa tekrar edildi.

buna bağlı olarak da antioksidan savunma sistemi üzerinde olumsuz etki yaptığı düşünülebilir. Büyükgüzel ve Kalender (2007)'nin antibakteriyel etkiye sahip streptomisinini kullanarak yaptığı çalışmada *Galleria mellonella*'nın larval evrelerinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak MDA miktarında artış görülmüş ve bu artış yukarıda belirtilen şekilde penisiline bağlı ROS oluşumu nedeniyle olabileceği ileri sürülmüştür. Penisilin'in 100 mg/L konsantrasyonunda *D. melanogaster*'in larval evresinin GST aktivitesinde yükselme, GPx aktivitesinde ise düşme gözlemlenmiş olup; benzer sonuçların Hyrsıl ve Büyükgüzel (2007) ve Büyükgüzel ve Kalender (2009) çalışmalarında da rapor edildiği görülmüştür. Bu durum antibiyotik stresinin olduğu koşullarda bazı GST izoformlarının (GSTpx) aktivitelerinin yeniden düzenlenebileceği Krishnan ve Sehnal (2006)'nın yaptığı çalışmada gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda larval evrede yüksek konsantrasyonlardan biri olan 400 mg/L penisilin konsantrasyonunu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PCO miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Kastamonuluoğlu ve ark. 2020 tarafından yapılan çalışmada da *G. mellonella*'nın yapay besiyerine bir antifungal madde olan terbinafin ilave edilmiş ve böceğin MDA ve PCO miktarlarında artış gözlenmiş ve bu artışın oksidatif stres göstergesi olduğu belirtilmiştir. Bir başka çalışmada, *D. melanogaster* üzerinde genotoksik bir karsinojen olan üretan uygulanmış ve MDA miktarındaki artış ile oksidatif hasar gösterilmiştir (Nagpal and Abraham 2017). Ardından bitkisel kökenli antioksidanlar diyet ile uygulanmış ve MDA miktarının düştüğü bulgusu elde edilmiştir. Bu şekilde MDA miktarı ile oksidatif hasar varlığı arasındaki bağlantı gösterilmiştir.



Böceğin pup evresinde 400 mg/L penisilin miktarında GST ve GPx aktivitesindeki artışa benzer Hyrs (2007), Büyükgüzel (2009) çalışmalarında da görülmüştür. Bu durum oksidatif strese karşı böceğin adaptif metabolik cevabının sonucu olabilir. Böcekler dünya üzerinde en fazla biyokütleyle sahip canlı grubudur. Aynı zamanda adaptasyon yetenekleri çok yüksek olduğundan çok farklı ortam şartlarında yaşayabilirler. Bu başarıları farklı şartlara metabolik yanıtlarını değiştirerek adapte olabilmeleridir (Reece 2010). Süperoksit dismutaz, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e dönüştürür ve ardından hidrojen peroksit CAT tarafından suya dönüştürülmektedir (Valko 2007). Liu (2019)'nun siprofloksasin ile yaptığı çalışmasında olduğu gibi bu iki antioksidan enzimin aktivitesinde görülen artışın ve azalmanın korelasyon göstermesi beklenir. Bu çalışmada larva evresinde 100 mg/L konsantrasyonda SOD aktivitesinde kontrol grubu ile istatistiksel bir fark görülmemesine rağmen azalma gözlenmiş ve bu durumun yansıması olarak CAT aktivitesinde de azalma tespit edilmiştir. Bu enzimlerin aktivitesindeki azalma ile MDA miktarındaki artış arasında bağlantı kurulabilir. Benzer bir sonuç Büyükgüzel (2009)'in streptomisin kullanılarak *G. mellonella* ile gerçekleştirdiği çalışmasında oksidatif strese karşı yanıt oluşturan CAT ve SOD aktivitesindeki azalmanın MDA miktarında artışa neden olabileceği ifade edilmiştir. Çalışmamızda, *D. melanogaster*'in pup evresinde MDA miktarındaki istatistiksel olarak anlamlı artış olmamasına karşın aynı evrede GST, SOD ve CAT enzim aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla artış görülmektedir. Benzer bir sonuç Kaur ve arkadaşlarının (2020) gerçekleştirdikleri çalışmada da gözlemlenmiştir. Antioksidan enzimlerin tamamının aktivitesinde gözlemlenen artışın oksidatif stres göstergesi olduğunu belirten birçok çalışma bulunmaktadır (Foyer et al. 1994, Ding et al. 2015, Kaur et al. 2020). Zorlu (2018)'nin çalışmasında bizim sonuçlarımıza benzer sonuçlar görülmüş olup; *G. mellonella* ile yapılan bu çalışmada diyetle alınan titanyum dioksit nanopartiküllerinin artan konsantrasyonlarda hemolenfte MDA artışına yol açtığı ve ROS oluşumuna bağlı oksidatif stres meydana geldiği ortaya konulmuştur. Zorlu (2018)'nin titanyum dioksit nanopartiküllerini yüksek dozlarda düşük dozlara göre daha etkili olduğu ve bu durumun MDA miktarındaki yükselmenin canlıda oluşan toksisiteye karşı verdiği yanıtla ilgili olabileceği ifade edilmektedir. Zorlu (2018)'nin çalışmasında MDA aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel farkın olmadığı en yüksek konsantrasyonda CAT aktivitesinde ciddi bir artış olduğu rapor edilmiştir. Bu duruma benzer bir durum bizim çalışmamızın pup ve ergin evrelerinde görülmektedir. MDA miktarında artan konsantrasyonlarda

kontrol grubuna göre bir fark görülmezken SOD ve CAT miktarında aktivitesinde değişiklikleri bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz enziminin ana görevi ksenebiyotik gibi hücre dışı faktörler tarafından oluşturulan süperoksit radikallerini oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüştürmektir. Bu bilgiye uyumlu olarak SOD aktivitesindeki artış literatürde farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Krishnan and Kodrick 2006, Yong Wang et al. 2012). Bu çalışmada pup evresinde SOD aktivitesinin 100 mg/L ve 200 mg/L konsantrasyonlarında yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu durum hem canlılığın artan konsantrasyonlara bağlı olarak adaptasyon göstermesi ile uyumlu hem de literatürde oksidatif stresin olduğu ve SOD yanıtının ölçüldüğü çalışmalarla uyum göstermektedir (Karthi et al. 2018, Kaur et al. 2020).

*Drosophila melanogaster*'in larva evresinde 400 mg/L de PCO miktarında görülen artış ile beraber GST, CAT ve SOD aktivitesinde düşüş olduğu görülmüştür. Bu durum protein karbonillerinin artışına bağlı olarak enzim yapılarında meydana gelen hasardan dolayı gerçekleşmiş olabilir (Keleş vd. 2021). Bu çalışmada elde edilen bulguları genel olarak şu şekilde açıklayabiliriz: Ksenobiyotikler iki detoksifikasyon yolu ile metabolize edilebilirler, böcekler söz konusu olduğunda bu yollar sonunda toksik etki gösteren madde ya nötralize olur ya da elemine edilir. Faz 1 reaksiyonları esasında ksenebiyotikleri faz 2 reaksiyonları için hazırlar. Faz 2 reaksiyonları sonucu oluşan ürünler daha çözünebilir ve taşınabilir hale gelirler. GST aktivitesi faz 2 reaksiyonlarında görev alan bir enzim olarak düşük aktivite gösterdiğinde faz 1 reaksiyonları sonucunda oluşmuş ve halen aktif olan reaktiflerin birikmesi söz konusu olabilir. Bir anlamda faz 2 reaksiyon yolağının tıkanması lipitler ve proteinler üzerindeki hasarın sebebi olabilir (Matés, 2000, Valko et al. 2007, Halliwell and Gutteridge, 2015, Anet et al. 2019).

Zararlı böceklerle mücadelede kullanılan pestisitler getirdikleri çözümlere rağmen başlıca çevre kirliliği oluşturmaları, sürdürülebilir olmamaları ve hedef olmayan canlılar üzerinde toksik etki gibi sorunlara neden olmaktadır (Dey 2016, Catae 2019, He et al. 2021). Pestisit olarak kullanılma alternatifleri ile beraber bazı kimyasalların laboratuvar koşullarında yetiştirilerek model organizma olarak bilimsel araştırmalarda kullanılan ve protein kaynağı olarak tüketilmek üzere yetiştirilme potansiyeli olan böceklerin besiyerlerinde mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacı ile çeşitli antimikrobiyal maddeler eklendiği literatürde belirtilmektedir (Cohen 2018, van der Fels-Klerx et al. 2018, Aslan et al. 2019, Ustundag et al. 2019).

Bu çalışmanın yukarıda ifade edilen konu başlıkları için yapılan çalışmalara katkı sağlayacak nitelikte olduğu düşünülmektedir. Daha öncede belirtildiği gibi Üstündağ ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan çalışmada geniş spektrumlu, beta-laktam özellikteki penisilinün laboratuvar koşullarında yapay besin ortamına ilave edilerek *D. melanogaster*'in tüm yaşama ve gelişme parametreleri üzerinde olumsuz etki yaptığı tespit edilmiş, bizim çalışmamız ile de penisilinün böcek üzerindeki bu olumsuz etkinin kaynakları araştırılmış; oksidatif stres belirteçlerinde ve antioksidan enzimler üzerinde önemli değişimlere sebep olduğu tespit edilmiştir.

## 5. Teşekkür

Bu çalışma "Farklı Etki Mekanizmasına Sahip Antimikrobiyal Maddelerin *Drosophila melanogaster*'in Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkisi" başlıklı doktora tez projesinden elde edilmiştir. 2022-50737594-01 kodlu proje desteği için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz. Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi ve Biyokimyası Araştırma Laboratuvarı'nın imkanlarını kullanmamızı sağlayan Prof. Dr. Kemal Büyükgüzel'e teşekkür ederiz.

## 6. Kaynaklar

- Abolaji, AO., Kamdem, JP., Farombi, EO., Rocha, JBT. 2013.** *Drosophila melanogaster* as a promising model organism in toxicological studies. *Arch. Bas. App. Med.*, 1(1): 33-38.
- Aebi, H. 1984.** Catalase in vitro. *Methods in Enzymol.*, 105: 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Anet, A., Olakkaran S., Purayıl AK., Puttaswamygowda, GH. 2019.** Bisphenol a induced oxidative stress mediated genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *J. Hazard. Mater.*, 370: 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.050>.
- Aslan, N., Büyükgüzel E., Büyükgüzel K. 2019.** Oxidative effects of gemifloxacin on some biological traits of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Environ. Entomol.*, 48 (3): 667-673. <https://doi.org/10.1093/ee/nvz039>.
- Bauer, H., Kanzok, S. M., Schirmer, HR. 2002.** Thioredoxin-2 but not thioredoxin-1 is a substrate of thioredoxin peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*. Isolation and characterization of a second thioredoxin in *D. melanogaster* and evidence for distinct biological functions of Trx-1 and Trx-2. *J. Biol. Chem.*, 277(20):17457-17463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200636200>.
- Büyükgüzel, E. 2009.** Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion. *J. Econ. Entomol.*, 102 (1): 152-159. <https://doi.org/10.1603/029.102.0122>.
- Büyükgüzel, E., Kalender, Y. 2007.** Penicillin-Induced oxidative stress: effects on antioxidative response of midgut tissues in instars of *Galleria mellonella*. *J. Econ. Entomol.*, 100 (5): 1533-1541. <https://doi.org/10.1093/jee/100.5.1533>.
- Büyükgüzel, E., Kalender, Y. 2008.** *Galleria mellonella* (L.) survivorship, development and protein content in response to dietary antibiotics. *Entomol. Sci.*, 43 (1): 27-40. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-43.1.27>.
- Büyükgüzel, E., Kalender, Y. 2009.** Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. *Pestic Biochem Phys.*, 94 (2): 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.04.008>.
- Büyükgüzel, K., Yazgan, Ş. 2002.** Effects of antimicrobial agents on the survival and development of larvae of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) reared on an artificial diet. *Turk J Zool.*, 26 (1): 111-119.
- Catae, AF., da Silva Menegasso, AR., Pratavieira, M., Palma, MS., Malaspina, O., Roat, TC. 2019.** MALDI-imaging analyses of honeybee brains exposed to a neonicotinoid insecticide. *Pest Manag. Sci.*, 75 (3): 607-615. <https://doi.org/10.1002/ps.5226>.
- Cohen, AC. 2015.** Insect diets: science and technology. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18562>.
- Corona, M., Robinson, GE. 2006.** Genes of the antioxidant system of the honey bee: Annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.*, 15 (5): 687-701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x>.
- Çelik, C., Büyükgüzel, K., Büyükgüzel, E. 2019.** The effects of oxyaclozanide on survival, development and total protein of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Entomol. Res. Soc.*, 21 (1): 95-108.
- Dey, D. 2016.** Impact of indiscriminate use of insecticide on environmental pollution. *Int. J. Plant Prot.*, 9 (1): 264-267. <https://doi.org/10.15740/has/ijpp/9.1/264-267>.
- Doğan, FN., Karpuzcu, ME. 2019.** Türkiye'de tarım kaynaklı pestisit kirliliğinin durumu ve alternatif kontrol tedbirlerinin incelenmesi. *Pamukkale Üniv. Müh. Bilim Derg.*, 25 (6): 734-747. <https://doi.org/10.5505/pajes.2018.53189>.
- Foyer, CH., Descourvieres, P., Kunert, KJ. 1994.** Protection against oxygen radicals - an important defense-mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, 17 (5): 507-523. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb00146.x>.

- Güneş, E., Büyükgüzel, E. 2017.** Oxidative effects of boric acid on different developmental stages of *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae). *Turk Entomol Derg.*, 41 (1): 3-15. <https://doi.org/10.16970/ted.59163>.
- Van der Fels-Klerx, HJ., Camenzuli, L., Belluco, S., Meijer, N., Ricci, A. 2018.** Food safety issues related to uses of insects for feeds and foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.*, 17(5):1172-1183. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12385>.
- Habig, HW., Pabst MJ., Jakoby WB. 1974.** Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.*, 249 (22): 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8).
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. 2015.** Free radicals in biology and medicine. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
- Hirsch, HVB., Lnenicka, G., Possidente, D., Possidente, B., Garfinkel, MD., Wang, L., Lu, X., Ruden, DM. 2012.** *Drosophila melanogaster* as a model for lead neurotoxicology and toxicogenomics research. *Front. Genet.*, 3 (68): 1-7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00068>.
- He, Y., Guo, C., Lv, J., Deng, Y., Xu, J. 2021.** Occurrence, sources, and ecological risks of three classes of insecticides in sediments of the liaoh river basin, china. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 28 (44): 62726-62735. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15060-5>.
- Huynh, MP., Meihls, LN., Hibbard, BE., Lapointe, SL., Niedz, RP., Ludwick, DC., Coudron, TA. 2017.** Diet improvement for western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae. *PLoS One*, 12 (11): e0187997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187997>.
- Hyršl, P., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K. 2007.** The effects of boric acid-induced oxidative stress on antioxidant enzymes and survivorship in *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol.*, 66 (1): 23-31. <https://doi.org/10.1002/arch.20194>.
- IBM SPSS Statistics 2021.** User's manual, version 28. SPSS, Chicago, IL, USA.
- Jain, SK., Levine, S., Levine, N. 1994.** Elevated lipid peroxidation and vitamin e-quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Rad Biol Med.*, 18 (2): 337-341. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00114-y](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00114-y).
- Karthi, S., Vaideki, K., Shivakumar, MS., Ponsankar, A., Thanigaivel, A., Chellappandian, M., Vasantha-Srinivasan, P., Muthu-Pandian, CK., Hunter, WB., Senthil-Nathan, S. 2018.** Effect of *Aspergillus flavus* on the mortality and activity of antioxidant enzymes of *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pestic Biochem Phys.*, 149: 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.05.009>.
- Kastamonuluoğlu, S., Büyükgüzel, K., Büyükgüzel, E. 2020.** The use of dietary antifungal agent terbinafine in artificial diet and its effects on some biological and biochemical parameters of the model organism *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 113 (3): 1110-1117. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa039>.
- Kaur, M., Chadha P., Kaur S., Kaur, A. 2021.** Effect of *Aspergillus flavus* on lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in midgut tissue of *Spodoptera litura* larvae. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.*, 54 (3-4): 177-190. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1826719>.
- Keles, V., Buyukguzel, K., Buyukguzel, E. 2021.** The effect of streptomycin on survival, development, and some biochemical aspects of *Drosophila melanogaster*. *Turk J Zool.*, 45 (6): 432-441. <https://doi.org/10.3906/zoo-2101-14>.
- Krishnan, N., 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. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.009>.
- Krishnan, N., Sehna, F. 2006.** Compartmentalization of oxidative stress and antioxidant defense in the larval gut of *Spodoptera littoralis*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 63 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1002/arch.20135>.
- Liu, J., Li, X., Wang, X. 2019.** Toxicological effects of ciprofloxacin exposure to *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 237: 124542. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124542>.
- Lushchak, VI. 2014.** Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.*, 224: 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.
- Marklund, S., Marklund, G. 1974.** Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.*, 47 (3): 469-474. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.
- Matés, JM. 2000.** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153 (1-3): 83-104. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00306-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00306-1).
- Nagpal, I., Abraham, SK. 2017.** Ameliorative effects of gallic acid, quercetin and limonene on urethane-induced genotoxicity and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Mech. Methods*, 27 (4): 286-292. <https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1278294>.
- Nair, RV., Kulye MS., Kamath, SP. 2018.** A single semi-synthetic diet with improved antimicrobial activity for mass rearing of lepidopteran insect pests of cotton and maize. *Entomol. Exp. Appl.*, 167 (4): 377-387. <https://doi.org/10.1111/eea.12779>.
- Paglia, DE., Valentine, WN. 1967.** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. lab. clin. med.*, 70 (1): 158-169. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214367900765>.

- Pajot, P. 1976.** Fluorescence of proteins in 6-M guanidine hydrochloride. *Euro J Biochem.*, 63 (1): 263-269. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10228.x>.
- Parvathi, DV., Amritha, AS., Paul, SFD. 2009.** Wonder animal model for genetic studies-*Drosophila melanogaster*-its life cycle and breeding methods-a review introduction. *Sri Ramachandra j. Med.*, 2 (2): 33-38.
- Pascacio-Villafán, C., Birke, A., Williams, T., Aluja, M. 2017.** Modeling the cost-effectiveness of insect rearing on artificial diets: a test with a tephritid fly used in the sterile insect technique. *PLoS One*, 12 (3): e0173205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173205>.
- Reece, JB., Urry, LA., Cain, ML., Wasserman, SA., Minorsky, PV., Jackson, RB. 2010.** Campbell biology. In *Campbell Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.
- Üstündağ, G., Büyükgüzel, K., Büyükgüzel, E. 2020.** Penicillin impact on survivorship, development, and adult longevity of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Entomol. Sci.*, 55 (4): 560-569. doi: <https://doi.org/10.18474/0749-8004-55.4.560>.
- Ustündağ, G., Buyukguzel, K., Buyukguzel, E. 2019.** The effect of niclosamide on certain biological and biochemical properties of *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biol.*, 78 (1): 29-39. <https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2019.0003>.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MTD., Mazur, M., Telser, J. 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39 (1): 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- Wang, Y., Oberley, LW., Murhammer, DW. 2001.** Antioxidant defense systems of two lipodipteran insect cell lines. *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (11): 1254-1262. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00520-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00520-2).
- Yao, P., Chen, X., Yan, Y., Liu, F., Zhang, Y., Guo, X., Xu, B. 2014.** Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana*. *Free Radic. Biol. Med.*, 68: 335-346. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.020>.
- Zorlu, T., Nurullahoğlu, ZU., Altuntaş, H. 2018.** Influence of dietary titanium dioxide nanoparticles on the biology and antioxidant system of model insect, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Entomol. Res. Soc.*, 20 (3): 89-103.