

Orijinal araştırma (Original article)

Niklozamidin *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın bazı biyolojik ve fizyolojik özelliklerine etkisi¹

The effect of niclosamide on some biological and physiological aspects of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)¹

Ender BÜYÜKGÜZEL^{2*}

Selver KAYAOĞLU³

Summary

The salisilanilides function by inhibiting mitochondrial oxidative phosphorylation in parasitic tapeworms and thus they are used as an antiparasitic drug in medicine and veterinary. While the potent antihelmintic activity of niclosamide has been well characterised in mammals, this study investigated the in vivo insecticide effect of niclosamide using larvae of the insect *Galleria mellonella*. Niclosamide was successful in decreasing the survival of 7th instar larvae, pupal and adult stages while only the highest concentration of this antihelmintic antibiotic (1.0 %) significantly prolonged developmental time to adult stage. Fecundity of females was obtained as 78.6 ± 6.1 number of eggs/day/female in control diet. Fecundity were increased to 114.7 ± 10.9 at 0.1% of niclosamide. However, we could not obtain any egg at the highest concentration. An increase in the male adult longevity was obtained when reared with the highest concentrations of niclosamide. Niclosamid rearing resulted in a decrease in hatchability of eggs. Niclosamide at 0.1 % of concentration increased malondialdehyde (MDA) content (4-fold), glutathion-S-transferase (GST) activity (2-fold). Relative to control (133.24 ± 23.6 nmol/mg protein), niclosamide at tested concentrations significantly increased protein carbonyl (PCO) content at least 5-fold (701.24- 808.02 nmol/mg protein). This work indicates that *G. mellonella* larvae may be used as a good model to ascertain importance of clinically important antihelmintic drug active ingredients in chemical management of pest insects. The results of this work also indicate that the negative effects of niclosamide on insect biology are due to its pro-oxidant properties and also to the ability of niclosamide in crippling the insect's antioxidant defence response.

Key words: *Galleria mellonella*, niclosamide, survivorship, malondialdehyde, protein carbonyl

Özet

Salisilanilidler bağırsak şeridi gibi parazitlerin mitokondrisinde oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek etkisini gösterirler ve bu antiparazitik ilaçlar tıpta ve veterinerlikte kullanılmaktadır. Niklozamidin potansiyel antihelmintik aktivitesi memelilerde iyi bir şekilde ortaya konulmuş, bu çalışmada da *Galleria mellonella* larvaları kullanılarak niklozamidin in vivo insektisit etkisi araştırılmıştır. Niklozamid, 7. dönem larva, pupa ve ergin evrelerinin yaşama oranını önemli derecede düşürürken, en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) ergin gelişme süresini önemli derecede uzatmıştır. Dişilerin yumurta verimi kontrol besininde 78,6 ± 6,1 yumurta sayısı/gün/dişi olarak tespit edilmiştir. % 0,1'lik niklozamid ile beslenildiğinde ise bu değer 114,7 ± 10,9 yumurta sayısı/gün/dişi' a yükselmiştir; bunun yanısıra en yüksek konsantrasyonda (% 1,0) hiç yumurta elde edilememiştir. Niklozamidin en yüksek konsantrasyonunda (% 1,0) erkek ergin ömür uzunluğu artmıştır. Ayrıca, niklozamid yumurta açılımını da denenen tüm konsantrasyonlarda önemli oranda düşürmüştür. % 0,1'lik niklozamid konsantrasyonunda malondialdehit (MDA) miktarı 4 kat, glutatyon-S-transferaz enzimi (GST) aktivitesi ise 2 kat artmıştır. Kontrol besinine göre (133,24 ± 23,6 nmol/mg protein) niklozamidin denenen konsantrasyonları protein karbonil (PCO) miktarını en az 5 kat (701,24 - 808,02 nmol/mg protein) önemli derecede arttırmıştır. Bu çalışmada *Galleria mellonella* model böcek olarak kullanılarak, böceklerle mücadelede belirli klinik öneme sahip antihelmintik ilaçların aktif şekilde kullanılabilirliği belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmanın sonuçları niklozamidin prooksidan etkisine bağlı olarak biyolojik ve aynı zamanda böceğin antioksidan savunma cevabı üzerine negatif etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Galleria mellonella*, niklozamid, yaşama oranı, malondialdehid, protein karbonil

¹ Bu çalışma Yüksek Lisans tezi olup BAP/2012-10-06-10 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

² Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 67100, İncivez, Zonguldak

³ Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 67100, İncivez, Zonguldak

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: endericen@hotmail.com

Alınış (Received): 04.10.2013

Kabul ediliş (Accepted): 27.12.2013

Giriş

Tarımsal alanlarda, ürünlerin gelişmesini engelleyen ve verimini düşüren her türlü zararlıdan korunmak için çeşitli pestisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal ilaçlar tarımsal alanlarda zararlı böcek popülasyonlarının mücadelesinde çok etkin bir yöntem olmasına karşın aşırı miktarda ve bilinçsizce kullanılması, ekosistem üzerinde olumsuz etkilere ve zararlı birçok böcek türünün bu tür ilaçlara karşı direnç kazanmasına neden olmaktadır (Özparlak, 2003). Bu tür kimyasal ilaçlar, subletal konsantrasyonlarda kullanılsalar bile, hedef organizma ile birlikte aynı habitatta yaşayan diğer hedef olmayan organizmalar üzerinde olumsuz etkilere sahiptirler (Simon et al., 1999; Barr et al., 2005; Morgan et al., 2005). Yapılan çalışmalar ışığında, doğal düşmanlar (bioinsektisitler) ile bazı kimyasal insektisitlerin hedef organizma üzerinde verimliliği azaltan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Takada et al., 2001). Ayrıca gelişim oranı (Willrich & Boethel, 2001), cinsiyet oranında değişiklik, diyapoz ve parazitoidlerle birlikte morfolojide direkt ve konukçu fizyolojisine bu maddelerin dolaylı olarak etki ettiği de bilinmektedir (Croft, 1990). Bazı sentetik kimyasal insektisitler, bitkisel insektisitler ve biyopestisitler böceklerde lipid, karbohidrat ve protein seviyelerini de etkilediği bilinmektedir (Barwal & Karla 2001; Seyoum et al., 2002; Vijayaraghavan & Chitra, 2002; Wang et al., 2005). Kimyasal mücadelede kullanılan maddelerin özellikle insektisit gruplarının ekosistem üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı zararlılarla mücadelede farklı arayışlara gidilmiş ve bu maddelere karşı koruyucu önlemler alınmaya başlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kimyasal ilaçlar yerine doğada var olan, zararlıların doğal düşmanları kullanılmaya başlanmış ya da geleneksel olarak kullanımda olan kimyasallar dışında çevreye daha az toksik maddelerin bulunmasına yönelik araştırmalar yapılmaktadır (Hill & Foster 2000, Xu et al., 2001; Sak et al., 2009; Ergin et al., 2007; Conrad et al., 2002; Lemos et al., 2003; Gündüz & Gülel, 2005). Yapılan bazı çalışmalarda klinik olarak önemli antimikrobiyal antibiyotikler zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılmaya başlanmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir (Büyükgüzel & Kalender 2007; 2008; Büyükgüzel, 2009; Jayaraj et al., 2008). Bu amaçla antibiyotik insektisitlere olan ilgi önem kazanmış ve bu konudaki çalışmalar gün geçtikçe yoğunlaşmaktadır. Daha önceki çalışmalarda antibiyotikler böceklerin yetiştirilmesini sağlayan yapay besin ortamına ilave edilerek mikrobiyal kontaminasyonları önlemek ve larvaların besin alımını uyarmak amacıyla kullanılmıştır (Pearson & Raybould, 1998; Büyükgüzel, 2001a; Büyükgüzel & Yazgan, 2002; Alverson & Cohen, 2002; Inglis & Cohen, 2004). Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda kullanılan antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarının gelişimi hızlandırdığı, yaşama oranını, ergin ömür uzunluğunu ve vücut ağırlığını arttırdığı, yüksek konsantrasyonların ise böcekler üzerinde olumsuz etkileri olduğu ortaya çıkarılmıştır (Chamberlain & Schol, 1991; Hirose et al., 2006). Ancak, bu antibiyotiklerin böceğin yaşama oranı, gelişme süresi ve diğer biyolojik özelliklerini etkileyecek düzeyde oksidatif strese sebep olup olmadığı ve bu strese karşı antioksidatif tepki mekanizmasının uyarıldığı konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Büyükgüzel & Kalender, 2007; 2008; Büyükgüzel, 2009).

Canlıların, çeşitli kimyasallara veya çevre kirliliğine neden olan maddelerin etkileri altında kalmaları, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna ve dolayısıyla metabolik olayların bozulmasına neden olur (Felton & Summers, 1995). İnsektisitler, serbest radikal oluşturma ve reaktif oksijen türlerini (ROT) ortan kaldıran enzimlerin yapısında da değişiklik meydana getirerek oksidatif stres oluşmasına sebep olmaktadır (Dettbarn et al., 2006; Giordano et al., 2007). Oksidatif stres sonucunda oluşan serbest radikallerin hücrede proteinler, lipitler, karbohidratlar, enzimler ve nükleik asitler üzerine önemli etkileri bulunmaktadır (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002). Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, organoklorlu ve organofosforlu (OP) pestisitler, poliklorlu bifeniller ve bitkisel allelokimyasalların da dahil olduğu diğer ksenobiyotikler bu tip oksidatif hasar ile önemli etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle lipid peroksidasyonunun ölçülmesi böyle bileşiklerin oksidatif etkilerinin değerlendirilmesinde indikatör olarak kullanılmaktadır (Valavanidis et al., 2006). Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan en basit ve en yaygın yöntem arakidonik asit ve diğer çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ve arakidonik peroksitlerin parçalanma ürünü olan aldehit türevi malondialdehid (MDA) miktarının belirlenmesidir (Spiteller, 2001). Böceklerde de MDA miktarının yükselmesi lipid peroksidasyonu seviyesinin önemli bir göstergesidir (Krishnan et al., 2009).

Protein oksidasyonu, ROT ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Gülbahar, 2007). Serbest radikallerin oksidan etkisi sonucu meydana gelen oksidatif protein modifikasyonu ve bunun sonucu oksitlenmiş proteinlerin fazla miktarda birikmesi hücre ve doku hasarına neden olur (Dean et al., 1997). ROT'nin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda protein karbonil (PCO) ürünleri meydana gelir (Levine et al., 1994; Evans et al., 1999). PCO düzeylerinin saptanmasının oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Levine et al., 1994).

Glutasyon-S-transferaz enzimi (GST) ksenobiyotiklerin biotransformasyonunda önemli rol oynayan faz II enzim sisteminin önemli bir enzimidir (Sheehan et al., 2001). GST'ler böceklerde insektisitlerden korunmada rol alan detoksifikasyon enzimlerinin büyük bir ailesidir (Yu, 2004). İnsektisit maruziyetine bağlı oluşan toksisiteyi ortadan kaldırmak için çoğu böcekte GST aktivitesinin yükseldiği saptanmıştır (Vontas et al., 2001). GST ve Glutasyon (GSH), reaktif türlerin konjugasyonu ve lipid peroksidasyonu ürünlerinin detoksifikasyonu ile oksidatif zararın önlenmesinde önemli bir rol oynarlar (Singh et al., 2001). GST, böceklerde insektisitlerin (Yu, 1996) ve konukçu bitkilerden salınan allelokimyasalların (Yu, 1993) metabolik detoksifikasyonunda, ROT'ların toksik etkilerinden böcekleri korumada (Vontas et al., 2001), aynı zamanda prostaglandin ve bazı hormonların biyosentezinde (Kanaoka et al., 2000) ve hücre içi iyon kanallarının düzenlenmesinde (Dulhunty et al., 2001) önemli role sahiptir.

Antihelmintik ilaçlar insan ve hayvanlarda sindirim kanalı, solunum yolları, karaciğer ve benzeri organlardaki parazitler üzerinde etkilidir. Antihelmintikler iç parazitleri ya konukçunun vücudunda öldürerek veya sadece vücut dışına atılmalarını sağlayarak hastayı parazitlerden arındırırlar (Grover et al., 2001). Bir antihelmintik olan niklozamidler parazitlerin mitokondrisinde oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek etkisini gösterirler. Ayrıca birçok helmintik paraziti ilgilendiren anaerobik metabolizmayı da inhibe edebilirler (Grover et al., 2001). Antihelmintik ilaçlar parazitlerde başlıca enerji metabolizmasını bozarak nöro-musküler iletimi etkiler, glukoz emilimi veya taşınmasını etkileyerek glikojen metabolizmasını bozar, glikolizi önler, nükleik asit sentezini ve sonuçta üremeyi engeller. Niklozamid, gastrointestinal kanalda önemli miktarda emilmeyip, dışkı ile vücuttan atılır. Emilen kısmı ise etkisiz bir metaboliti olan aminoniklozamide çevrilir (Şanlı & Kaya, 1994). Niklozamidin antihelmintik etkisinin dışında son zamanlarda *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) kullanılarak yapılan bir çalışmada bakterisit etkisi olduğu gösterilmiştir (Imperi et al., 2013). Hayvanlar tarafından dışkı ile dış ortama bırakılan sistemik insektisit olarak da etki gösteren avermektin gibi antiparaziter antibiyotiklerin dışkının parçalanmaları ve besin zinciri sırasında hedef olmayan canlıların gelişimi ve yaşama oranını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (Halley et al., 1989). Ayrıca, çalışmada kullanılan antihelmintik ilaca benzer şekilde bakteriyel ve protozoal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan furazolidonun sivrisinek türü *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae) larvalarına oldukça toksik etki yaptığı gösterilmiştir (Macri et al., 1988).

Bu çalışmada kullanılan büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan bazı küf, mantar ve bakterilerin patojenitesini belirlemede memeli deney hayvanlarına alternatif omurgasız bir konukçu model sistemi olarak (Miyata et al., 2003; Altincicek et al., 2007; Joyce et al., 2010; Mukherjee et al., 2010) ve böcek-insektisit etkileşimi ile ilgili biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalar için model olarak kullanılabilen oldukça uygun bir böcektir (Büyükgüzel & İçen, 2004; Büyükgüzel & Kalender, 2008). Mevcut çalışmada antihelmintik ilaçların zararlı böceklerin mücadelesinde insektisit olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, niklozamidin *G. mellonella* gelişme dönemleri ve ergin biyolojisi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu maddenin böceğin 7. dönem larvalarının orta bağırsak dokusunda lipid peroksidasyonu seviyesini gösteren MDA miktarında, oksidatif protein modifikasyonunu gösteren PCO miktarında ve detoksifikasyon enzimi GST aktivitelerinde sebep olduğu değişimler incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Galleria mellonella L. kültürü

Lepidoptera takımına ait bir böcek olan *G. mellonella* L. kültürünün devamı, yumurtadan yeni çıkmış larvaların Bronskill (1961) tarafından geliştirilen yarı sentetik besinde (420 g buğday kepeği, 150 ml süzme bal, 150 ml gliserin (Merck, Darmstadt, Germany), 20 g öğütülmüş koyu renkli eski petek, 30 ml saf su) aseptik olmayan şartlarda yetiştirilmesi ile sağlanmıştır. Böcek kültürünün devamı 28 ± 2 °C ve % 65 ± 5 bağıl neme ayarlı bir inkübatörde (Nüve, ES 500), gün boyu devamlı karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Niklozamidin deneylerde kullanılması

Niklozamid (2',5-Dikloro-4'nitrosalisilanilid, beyaz sarı toz, % 98) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir. Yürütülen beslenme deneylerinde niklozamidin denenen miktarlarının konsantrasyonu 100 gram besin başına gram antibiyotik (% a/a) olarak belirtilmiştir. Niklozamid içermeyen kontrol besini hariç niklozamidin *G. mellonella* için % 0,001, 0,01, 0,1 ve 1,0 olmak üzere dört farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. Niklozamid konsantrasyonları *G. mellonella* (Büyükgüzel & Kalender 2007; 2008; Büyükgüzel, 2009) ve bazı parazitoid böcek türleri (Büyükgüzel, 2001; Büyükgüzel & Yazgan, 1996) üzerinde yapılan önceki çalışmalar temel alınarak tespit edilmiştir.

Yaşama oranı ve gelişme süresi

Niklozamidin belirlenen miktarlarını içeren besinler uygun besin kaplarına (Cam kavanozlar, 60 x120 mm) paylaştırılmıştır. Her bir besin kabına 20 larva konularak, deneyler dörder kez tekrar edilmiştir. Niklozamid içeren besinlere bırakılan larvalar olgun 7. dönem larvalarını meydana getirdikten sonra pupa olmaları için içerisinde ince pelur kağıt bulunan 30 ml'lik plastik örnek kaplarına (ORLAB, L190030, 35x55 mm) her kapta bir olgun larva (7. dönem larva) olacak şekilde bırakılmıştır. Bu larvalardan pupa olan ve erginleşen bireylerin oranı ve bu evrelere ulaştıkları süre belirlenmiştir. Erginleşen bireylerin erkek ve dişi oranı ve ömür uzunlukları tespit edilmiştir. Deneylerde kullanılan erginlerin eşey ayrımı, ergin dönemdeki böceklerin vücut büyüklüğüne ve abdomenlerinin son segmentindeki genital bölgeye göre yapılmıştır.

Ergin ömür uzunluğu

Niklozamidin farklı konsantrasyonlarında yetiştirilen ergin bireylerin ömür uzunluğuna etkisini tespit etmek için yumurtadan yeni çıkmış *G. mellonella* larvaları ergin evreye kadar yetiştirilmiştir. Her bir deney için 10 adet ergin kullanılarak, deneyler dörder defa tekrarlanmıştır. Elde edilen ergin bireyler 30 ml'lik, geniş ağızlı, şeffaf, delikli kapaklı plastik kaplara (ORLAB, L190030, 35x55 mm) birer adet konulmuştur. *G. mellonella* ergin evresinde beslenme ihtiyacı olmadığından ömür uzunluğu deneyleri esnasında ergin böceğe besin verilmemiştir. Deneyler stok kültürün yapıldığı ortam şartlarında yapılmıştır. Erginler, her gün belirli saatte kontrol edilerek en son erginin ölümüne kadar her erginin yaşama süresi tespit edilmiştir.

Yumurta verimi ve açılma oranı

Denenen niklozamid konsantrasyonlarının *G. mellonella* dişilerinin yumurta verimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yumurtadan yeni çıkan larvalar bu antihelmintik antibiyotiğin bulunduğu besinlerde ergin evreye kadar beslenmiştir. Yumurta verimi için yeni erginleşmiş ve döllenmemiş bir günlük dişiler kullanılmıştır. Her bir deney için 10 adet dişi kullanılarak, deneyler dörder defa tekrarlanmıştır. Bu dişiler geniş ağızlı, delikli kapaklı, plastik kaplara (15 ml, ORLAB) her kapta bir adet dişi olacak şekilde bırakılmıştır. Ön denemelerden elde edilen sonuçlara göre erginleşen dişilerin ilk 48-72 saat içinde yumurtalarını bıraktığını gözlenmiştir. Bu yüzden ilk 2-3 gün içinde bırakılan yumurtalar sayılmıştır. Yumurta verimi, bir günde dişi başına bırakılan yumurta sayısı olarak ifade edilmiştir. Her gün açılan larvalar yine siyah bir zemin üzerinde sayılarak ortalama sayısı kaydedilerek, yumurtaların açılma oranı belirlenmiştir.

Orta bağırsak izolasyonu

7. döneme kadar yetiştirilen *G. mellonella*'nın larvalarının orta bağırsak diseksiyonu yapılmadan önce larvalar buz üzerinde 5 dk bekletildikten sonra % 95 etil alkol ile yüzeyleri dezenfekte edilerek parafinle doldurulmuş petri kabına sırt kısmı parafine gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra larvalar karın kısmından orta eksen boyunca ince uçlu diseksiyon makası ile kesilmiştir. Streomikroskop (Olympus SZ61, Tokyo, Japan) altında ince uçlu bir pens yardımıyla sindirim kanalının orta bağırsağın olduğu bölüm izole edilerek, bu bölüme tutunmuş olan diğer dokular ve bağırsak içeriği uzaklaştırılmıştır. İzole edilen orta bağırsaklar, soğuk homojenizasyon tamponu [% 1,15'lik potasyum klorür (KCl) a/h, 25 mM dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), 5 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenilmetilsülfonil (PMSF), 2 mM ditiyotreitol (DTT), pH: 7,4] ve birkaç feniltiyöüre kristali bulunan bir ependorf tüpe aktarılmıştır. Dokular analiz yapıncaya kadar derin dondurucuda (-80 °C) bekletilmiştir. Deneyler her bir tekrarda 15 ortabağırsak kullanılarak dörder defa tekrarlanmıştır.

Malondialdehid (MDA)

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA miktarı Jain & Levine (1995)'nin kullandığı metod temel alınarak 532 nm'de ölçülmüştür. Orta bağırsak % 1,15'lik KCl ile ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile parçalanmıştır. Daha sonra örneklere pH 7,4 olan fosfat tamponu, 0,04 M butillenmiş hidroksi toluen (BHT), % 30'luk triklorasetik asit (TCA)] eklenerek 2 saat buzun içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra 4 °C de, 2000 x g devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı alınıp, üzerine 0,1 M EDTA ve % 1'lik TBA ilave edilmiş ve kaynar su banyosunda 45 dakika bekletilmiştir. Tüpler oda sıcaklığına geldikten sonra spektrofotometrede (Shimadzu 1700 UV/Vis, Kyoto, Japan) 532 nm'de absorbansı okunmuştur. MDA miktarı $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak belirlenmiştir.

Protein karbonil

Levine et al. (1994)'in metodu temel alınıp bir ölçüde değiştirilerek (Krishnan & Kodrik, 2006) 370 nm'de Protein karbonil tayini yapılmıştır. Örnekler, pH: 7,4 olan homojenizasyon tamponunda ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile + 4 °C'de parçalanmıştır. Elde edilen özüt + 4 °C'de 1000 x g'de 10 dk santrifüj (Hettich Zentrifugen, Mikro 200 R soğutmalı santrifüj) yapılmıştır. Santrifüj yapılan tüplerden üst sıvı alınıp üzerine % 10'luk streptomisin sülfat ilave edilerek 37 °C'de 15 dk su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra 8000 x g'de + 4 °C'de santrifüj edilerek nükleik asitler çöktürülmüştür. Üst sıvıdan 200 µl alınarak üzerine 800 µl 10 mM 2,4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) eklenmiştir. Oda ısısında bir saat veya su banyosunda 37 °C'de 15 dk belirli aralıklar ile çalkalamak suretiyle beklenmiştir. Daha sonra tüplere 700 µl % 20'lik TCA ilave edilerek buz üzerinde 10 dk bekletildikten sonra + 4 °C'de 10000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Böylece oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazon bileşikleri çöktürülmüştür. Üst sıvı atılarak çöküntü üzerine 1:1 oranında 1 ml etanol: etil asetat karışımı ilave edilerek, vorteks ile yavaşca homojenize edilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrarlanıp her defasında 10000 x g'de + 4 °C'de santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır. En son santrifüjleme işleminden sonra çöküntü üzerine 2,5 ml 6 M guanidin hidroklorür ilave edilerek iyice 37 °C'de 10 dk (oda ısısında 45 dk) karıştırılmak suretiyle çöküntü çözülmüştür. Kaba partiküllerin çökmesi için 10000 x g'de 10 dk + 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvının absorbansı 370 nm de kör tüpe karşı spektrofotometrede (Shimadzu 1700 UV/Vis, Kyoto, Japan) okunarak protein karbonil miktarı $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak verilmiştir.

Glutasyon S-transferaz (GST)

GST aktivitesinin ölçümünde Habig et al. (1974) tarafından geliştirilen metod uygulanmıştır. CDNB 340 nm'de yükselen absorbans gösteren glutasyon oksidasyonunu katalizleyen GST enzimi için substrat olarak kullanılmıştır. Örnekler +4 °C'de ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin,

Germany) (10 sn, 30 W) homojenize edilmiştir. +4 °C'de 16000 x g devirde homojenize edilen örnekler, santrifüj edilmiştir. Üst sıvılar alınarak GST aktivitesinin ölçümünde kullanılmıştır. Enzim aktivitesi 340 nm'de (ϵ_{340} : 0,0096 $\mu\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}$) süpernatantta bulunan 1 mg toplam protein başına 1 dakikada oluşturulan tioether miktarı olarak ölçüldü ve enzimin spesifik aktivitesi $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/dk olarak ifade edilmiştir.

Orta bağırsak örneğinden elde edilen süpernatanttan GST'nin spesifik aktifliğini hesaplamak ve MDA miktarını mg protein başına vermek için çözünür toplam protein tayini yapılmıştır. Bu amaçla örneklerin absorbansı spektrofotometrede 600 nm'de Folin-Lowry (Lowry et al., 1951) metoduna göre ölçülerek total protein miktarı tespit edilmiştir.

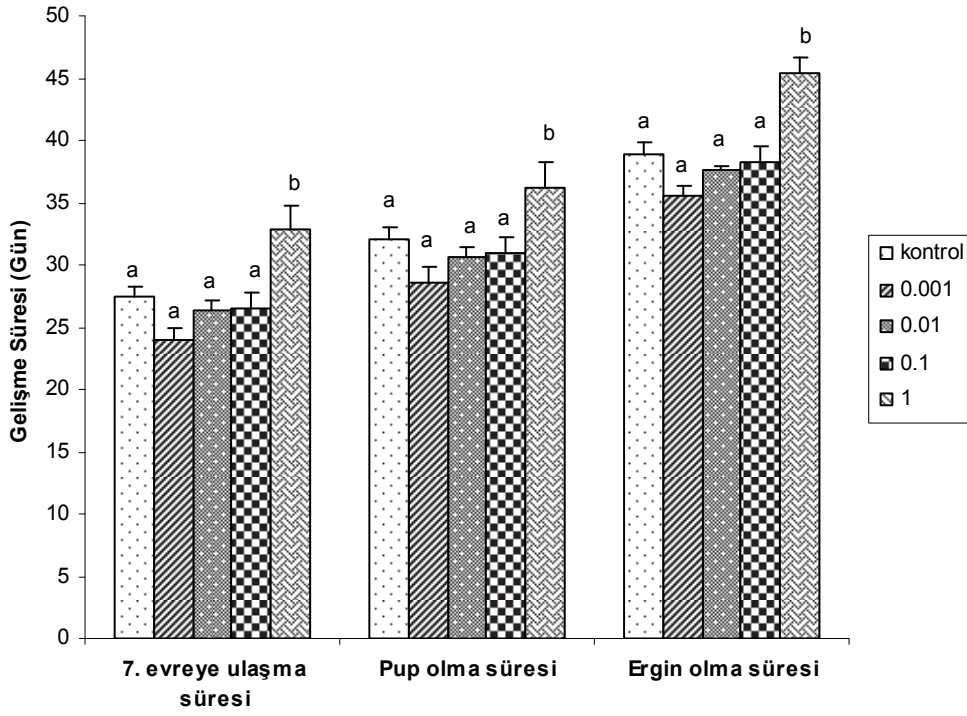
Verilerin değerlendirilmesi

Gelişme süresi, erginlerin ömür süresi, dişilerin yumurta verimi ve yumurtaların açılma oranı, 7. dönem larvalarının orta bağırsaktaki MDA ve protein karbonil miktarı ve GST aktivitesinin değerlendirilmesinde tek yönlü "Varyans Analizi" (ANOVA) (SPSS, 1997), ortalamalar arasındaki farkın önemini saptamak için "LSD Testi" (SPSS, 1997), yaşama ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde ise " χ^2 (Chi square) Testi" (Snedecor & Cochran, 1989) kullanılmıştır. Ortalamaların önemi 0,05 olasılık seviyesinde değerlendirilmiştir.

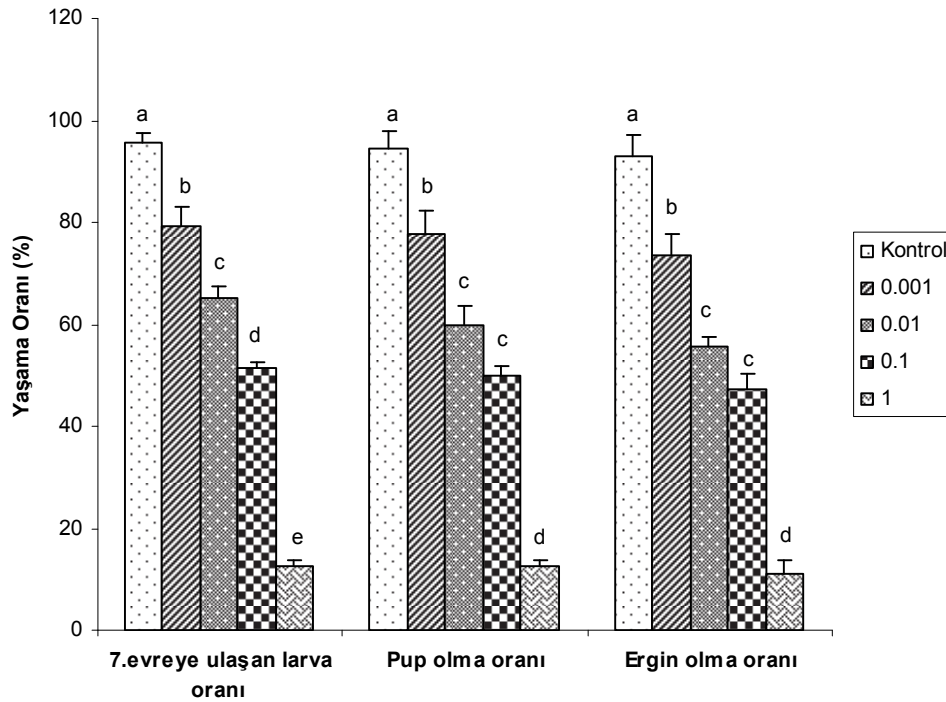
Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* L. yapay besin ortamında beslenerek salisilanilid türevi bir antihelmintik antibiyotik olan niklozamidin böceğin yaşama, gelişme, ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu, yumurta verimi, açılma oranı gibi biyolojik özellikleri üzerine etkisi laboratuvar şartlarında incelenmiştir. Ayrıca bu antihelmintik antibiyotik böceğin 7. dönem larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyonu ürünü MDA ve protein oksidasyonu ürünü PCO ile detoksifikasyon enzimi GST aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

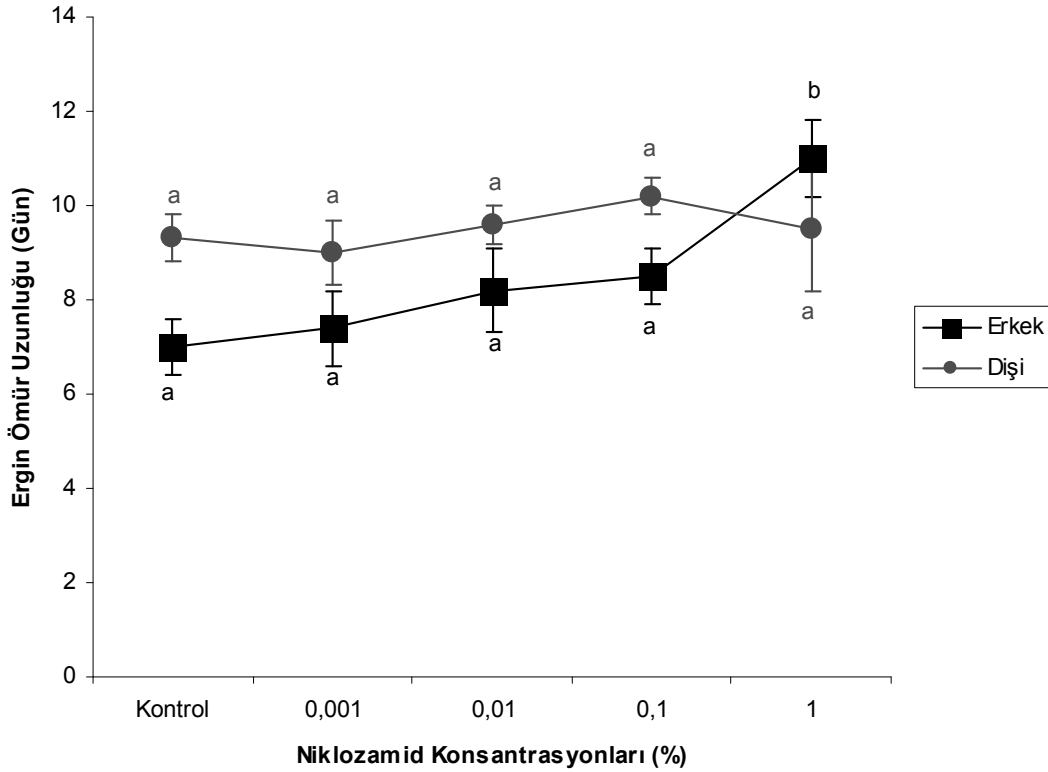
Kontrol besinine göre niklozamidin tüm denenen konsantrasyonları yaşama oranını önemli derecede azaltmış, özellikle niklozamidin en yüksek konsantrasyonu böceğin larval gelişimini 5 gün, pupal gelişimini 4 gün, ergin evreye gelişimini ise 6 gün ($45,4 \pm 1,3$ gün) geciktirmiş, benzer şekilde 7. döneme ulaşma oranını, pup olma oranını ve ergin olma oranını da önemli derecede düşürmüştür (Şekil 1, 2). Yapılan bir çalışmada kimyasal yapısı bilinen sentetik besine ilave edilen penisilin, streptomisin, rifampisin endoparazitoid hymenopter türü olan *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) 'nın yaşama oranını düşürdüğü ve gelişimini geciktirdiği belirtilmiştir (Büyükgüzel & Yazgan, 1996). Bulgularımızı destekleyen bir başka çalışmada, hymenopter parazitoidlerinden *Aphytis holoxantus* (Hymenoptera: Aphelinidae) ve *Pteroptrix smithi* (Hymenoptera: Aphelinidae)' nin konukçusu olan *Chrysompalus aonidum* (Hemiptera: Diaspididae)'un gelişiminin farklı evrelerinde subletal dozda malathionlu besinle beslemiş, bunun sonucunda parazitoidlerde ergin çıkışının azaldığını, konukçuda larva, pupa ve ergin ölüm oranının arttığı gösterilmiştir (Cohen et al., 1988). Diğer bir çalışmada da altı adet insektisit beyaz sinek *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae)'nin parazitoidleri olan *Eretmocerus tejanus* (Hymenoptera: Aphelinidae) ile *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae)'un genç larvaları ile pupaları üzerine letal ve subletal etkileri araştırılmış, organik fosforlu ilaçlardan metil parathion ve azinfos metil'in ergin olma oranını azalttığı, denenen tüm insektisitlerin subletal dozlarının da parazitoid böceklerin ömür uzunluğu ve yumurta verimini olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir (Jones et al., 1998). Bu antihelmintik maddenin denenen en yüksek konsantrasyonu erkek ömür uzunluğunu $7,0 \pm 0,6$ günden $11,0 \pm 2,2$ güne ortalama 4 gün uzatırken, dişi ömür uzunluğunu ise etkilememiştir (Şekil 3). Bulduğumuz sonuçla uyumlu olarak, Fitzpatrick & Dowell (1981), *Aleurocantus woglumi* (Homoptera: Aleyrodidae)' ye 14 farklı insektisit uygulamış ve bu böceğin parazitoidleri olan *Amitus hisperidum* (Hymenoptera: Platygasteridae) ve *Prospaltella opulenta* (Hymenoptera: Aphelinidae)'nın dördüncü larval evresinde yumurta açılımı ve ömür uzunluğuna bütün insektisitlerin etkili olduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 1. Niklozamidin *G. mellonella* larvalarının gelişme süresine etkisi. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P > 0,05$ (LSD testi).

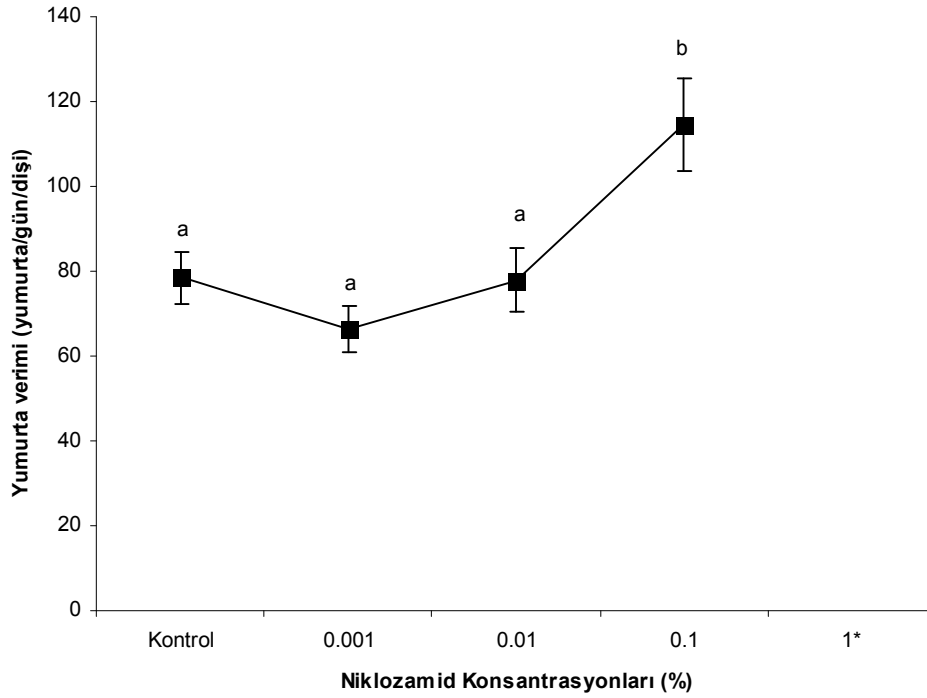


Şekil 2. Niklozamidin *G. mellonella* larvalarının yaşama oranına etkisi. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P > 0,05$ (LSD testi).



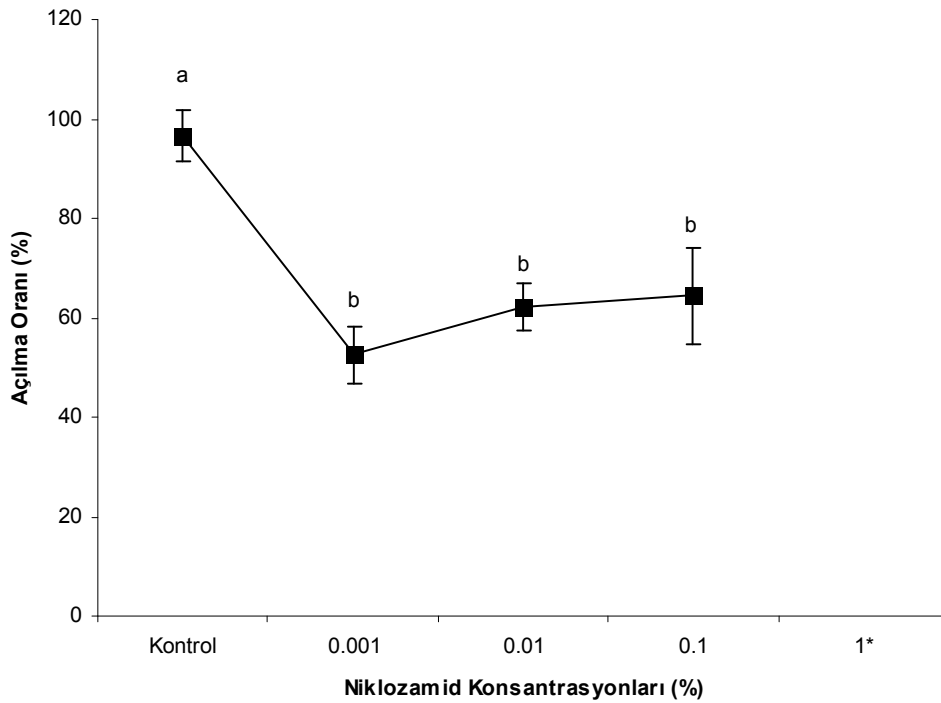
Şekil 3. Niklozamidın *G. mellonella* dişi ve erkek ergin ömür uzunluğuna etkisi. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P > 0,05$ (LSD testi).

Kontrol besini ile karşılaştırıldığında, niklozamidin % 0,1'lik konsantrasyonunu içeren besin yumurta verimini önemli derecede artırmış olup, yumurta sayısını dişi başına bir günde $114,7 \pm 10,9$ 'ye yükseltmiştir. Buna karşın, niklozamidin en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) ile yetiştirilen dişilerin hiç biri yumurta bırakmamıştır (Şekil 4). Düşük konsantrasyondaki artış, böceğin bu besinsel ortamdaki konsantrasyona karşı bir adaptasyon davranışı olabilir. Gaaboub & Dawood (1974)'a göre, beş generasyon boyunca *Culex pipiens*'i malathionun belirli konsantrasyonuna maruz bırakılmış ve bunun sonucunda fertilitenin önemli derecede düştüğü tespit edilmiş, bir başka çalışmada da Zettler & LeCato (1974), subletal dozdaki malathionun *Attagenus negatoma* (Coleoptera: Dermestidae)'da fertilitayı önemli derecede azalttığını göstermiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Niklozamid içermeyen kontrol besine göre, denenen tüm niklozamid konsantrasyonları yumurtaların açılma oranını önemli derecede düşürmüştür. Niklozamid içermeyen kontrol besini ile yetiştirilen dişilerin bıraktığı yumurtaların % $96,6 \pm 5,3$ 'sü açılmasına karşın niklozamidin % 0,1'lik konsantrasyonu bu açılma oranını % $64,4 \pm 9,6$ 'e düşürmüştür (Şekil 5). Mullens & Rodriguez (1992) % 1 ve 2'lik disodyum oktaborat tetrahidratın *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) ve *Fannia femoralis* (Diptera: Muscidae) dişilerinin yumurta açılımını % 10'un altına düşürdüğünü belirtmişlerdir. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olan bir başka çalışmada da tropik meyve sineği *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) erginlerinin % 4'lük sodyum tetraborat içeren besin ile beslenmesi erginlerin ölüm oranını artırdığı gibi yumurta verimini ve açılımını önemli derecede düşürdüğü belirtilmiştir (Yang et al., 2000).



Şekil 4. Niklozamidin *G. mellonella* dişilerinin yumurta verimine etkisi. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P > 0,05$ (LSD testi).

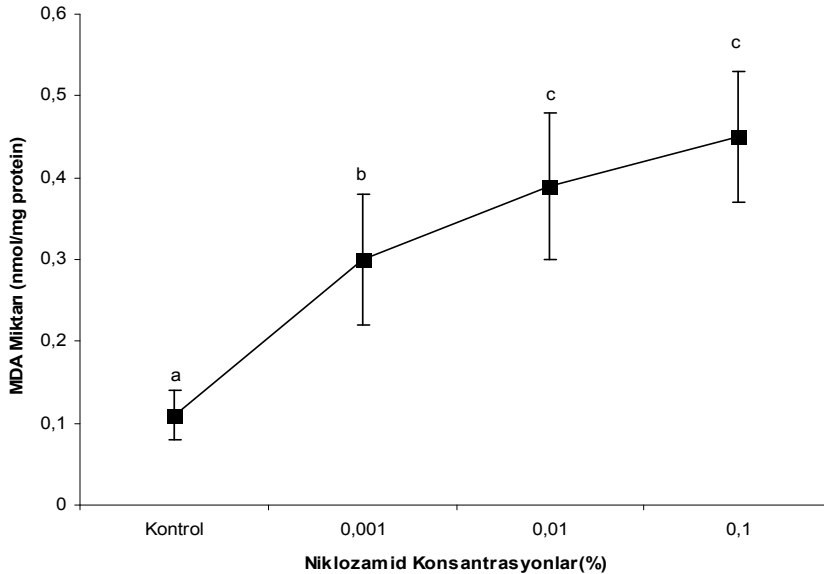
* % 1,0 Niklozamid içeren besin ile yetiştirilen dişilerden yumurta elde edilmemiştir.



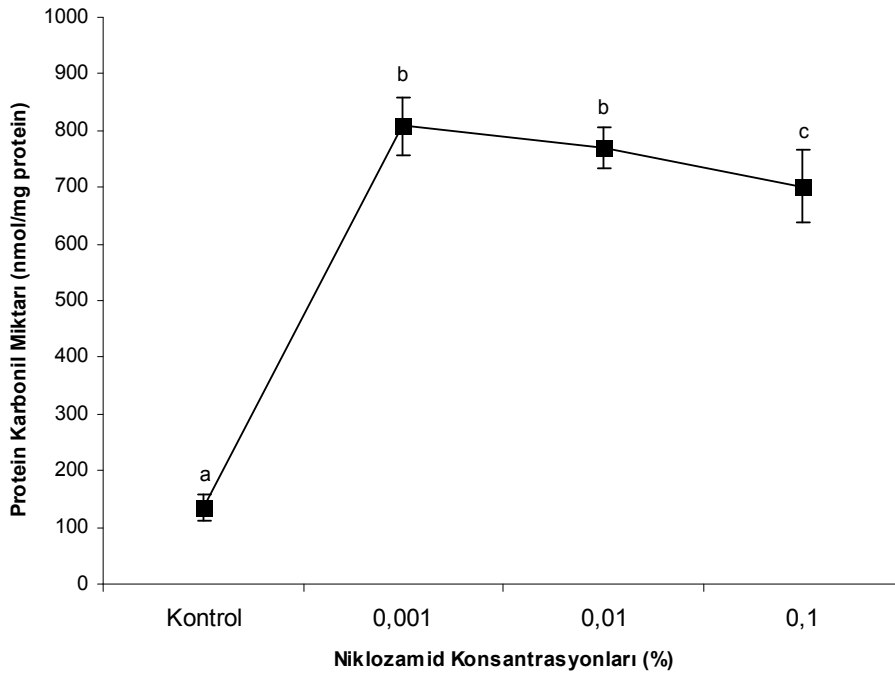
Şekil 5. Niklozamidin *G. mellonella* dişilerinin yumurta açılımına etkisi. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P > 0,05$ (LSD testi).

* % 1,0 Niklozamid içeren besin ile yetiştirilen dişilerden yumurta elde edilemediğinden, yumurta açılma oranı tespit edilememiştir.

Böcekler, hayatsal faaliyetlerini gerçekleştirebilmek için protein, lipit ve karbohidrat gibi önemli biyomoleküllere ihtiyaç duyarlar. Bu biyomoleküller, gelişim evrelerindeki farklılık, diyapoz, besin kalitesi, mevsimsel değişiklik, sıcaklık, cinsiyet, eşeyssel aktivite ve insektisit uygulamaları gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Yanıkoğlu, 1985; Ito, 1989; Pullin, 1992; Aktümsek, 1996; Warburg & Yuval, 1996; Özalp & Emre, 1998; Socha et al., 1998; Ito & Nakata, 1998; Şeker & Yanıkoğlu, 1999; George et al., 2002; Bozkurt, 2003). İnsektisitlerin, böceklerde oksidatif stres meydana getirerek serbest radikal oluşturması ve bu oluşan reaktif moleküllerin de protein, lipit, karbohidrat, nükleik asitler ve enzimler üzerine önemli derecede etkileri bulunmaktadır (Damien et al., 2004). Kontrol besinine göre niklozamidin tüm konsantrasyonları MDA miktarını önemli derecede artırmıştır. Niklozamidin % 0,001'lik oranını içeren besin MDA miktarını yaklaşık 2,5 katı artırarak $0,30 \pm 0,08$ nmol/mg protein'e yükseltmiştir. Buna karşılık, niklozamidin denenen en yüksek konsantrasyonu 7. dönem larvalarının orta bağırsak MDA miktarını önemli derecede artırmıştır (Şekil 6). Bu antibiyotiğin % 0,01'lik konsantrasyonu MDA miktarını $0,11 \pm 0,03$ 'den $0,39 \pm 0,09$ nmol/mg protein'e önemli derecede yükseltmiştir. En yüksek niklozamid konsantrasyonu (% 0,1) kontrol besinine göre MDA miktarını yaklaşık 4 katı oranında artırmıştır. Niklozamidin denenen tüm konsantrasyonları 7. dönem larvalarının orta bağırsağındaki bir aldehit türevi olan MDA'yı indüklemiş olabilir. Daha önce yapılan bir çalışmada organofosfat insektisitlerin belirli konsantrasyonlarına maruz kalan böceklerde MDA miktarının arttığı gösterilmiştir (İçen et al., 2005; Büyükgüzel, 2006; 2009; Yu et al., 2011). PCO, MDA gibi oksidatif stresin önemli belirteçlerinden biridir. PCO miktarındaki artış, oksidatif stresin şiddeti hakkında bilgi vermektedir. Protein böceklerde, normal gelişmeleri ve üremeleri için gerekli besinsel biyomoleküldür (Dadd, 1985). Buna bağlı olarak gerek besinsel proteinlerin yapısının bozulması gerekse vücut proteinlerinde meydana gelen oksidatif hasar böceğin hem gelişim hem de biyolojik özellikleri üzerinde etkili olması beklenir. Niklozamid bulunmayan kontrol besininde PCO miktarı 133 ± 23 nmol/mg protein olarak belirlenmiş, bu değer % 0,001'lik niklozamid konsantrasyonunda $808,02 \pm 52,1$ nmol/mg protein'e yükselmiştir. Benzer bir durum niklozamidin % 0,01'lik ve % 0,1'lik konsantrasyonlarında da gözlenmiş olup, PCO miktarını sırasıyla $768,61 \pm 35,7$; $701,24 \pm 64,3$ nmol/mg protein'e yükselmiştir (Şekil 7).Yapılan bu çalışmada böceğin orta bağırsak PCO miktarındaki artış, böcekte niklozamid tarafından meydana getirilen oksidatif strese karşı proteinlerin okside olduğunu göstermektedir. Serbest radikallerin etkisi ile oluşan oksidatif protein modifikasyonuna bağlı olarak yapı ve işlevi bozulmuş proteinlerin fazla miktarda birikmesi sonucu hücre hasarı oluşabilmekte ve sonunda bu süreç hücre ölümüne kadar uzayabilmektedir (Dean et al., 1997).



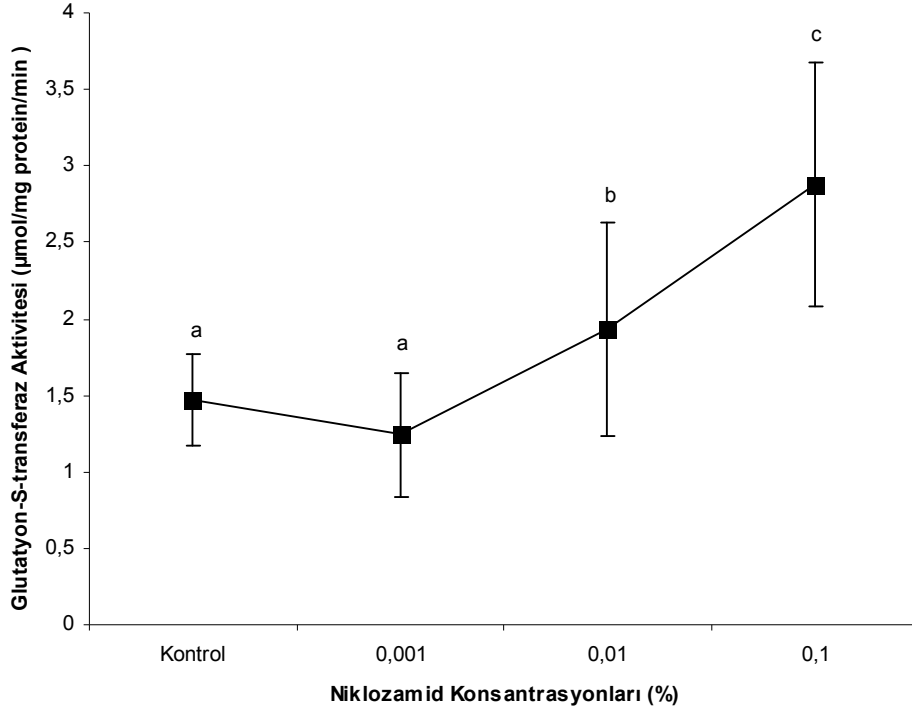
Şekil 6. Niklozamidın *G. mellonella* orta bağırsağındaki MDA miktarına etkisi. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P > 0,05$ (LSD testi).



Şekil 7. Niklozamidin *G. mellonella* orta bağırsağında protein karbonil miktarına etkisi. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P > 0,05$ (LSD testi).

Oksidatif strese neden olan organik ksenobiyotiklerin çevresel etkilerini belirlemek için GST enzimi önemli bir belirteçtir (Monteiro et al., 2006; Otitoju & Onwurah, 2007). Böceklerdeki GST'nin biyotransformasyon görevinin yanında Glutasyon peroksidaz aktivitesi (GST-Gpx) ile oksidatif hasardan koruyarak antioksidan savunmaya katkıda bulunduğu bilinmektedir (Singh et al., 2001; Vontas et al., 2001; Ding et al., 2005). Niklozamidin en düşük konsantrasyonu GST aktivitesinde azalmaya sebep olmasına karşın istatistiksel olarak önemli bir etki yapmamıştır. Buna karşılık, % 0,01 ve 0,1'lik niklozamid konsantrasyonları GST aktivitesini önemli derecede arttırmıştır (Şekil 8). Niklozamid içermeyen kontrol besin ile yetiştirilen larvaların orta bağırsak GST aktivitesi $1,47 \pm 0,3 \mu\text{mol/mg protein/dk}$ olarak tespit edilmiştir. En yüksek niklozamid konsantrasyonu GST aktivitesini yaklaşık 2 katı artırarak $2,88 \pm 0,8 \mu\text{mol/mg protein/dk}$ 'ya kadar yükseltmiştir. Bu sonuçlar besinsel niklozamidin yüksek konsantrasyonlarının böceğin biyolojik parametreleri üzerindeki olumsuz etkilerinin, bu antihelmintik antibiyotik prooksidatif etkisine bağlı olabileceğini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada da pretroidlere karşı savunmada böceklerin GST aktivitesinin arttığı, benzer bir şekilde insektisitlere maruz kalma sürelerine bağlı olarak GST aktivitesinin yükseldiği ve böylece bu enzimin insektisitlere karşı direncin sağlanmasında da etkili olduğu bulunmuştur (Kostaropoulos et al., 2001). *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında GST aktivitesi niklozamid ile uyarılmış olabilir ve buna bağlı olarakta GST'nin indüklenmiş peroksidaz aktivitesi ile MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin böceğe zarar verecek düzeye ulaşması önlenmiş olabilir. Yu et al. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ipekböceği bir organofosfat insektisite maruz bırakıldığında böceğin yağ dokusundaki GST aktivitesinin orta bağırsaktakine göre daha fazla olduğunu ortaya çıkarılmıştır. *G. mellonella*'nın orta bağırsağındaki GST aktivitesi, uygulanan antihelmintik antibiyotik ve metabolizma ürünlerini detoksifiye etmek için yükselmiş olabilir. Bir başka çalışmada, mısır ve çimenlerde bulunan güçlü antibiyotik etkisi gösteren (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3) DIMBOA'nın bir afit türü olan *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae)'nın detoksifikasyon enzimleri esteraz ve GST'nin aktivitelerini önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir

(Mukanganyama et al., 2003). Diğer bir çalışmada da endosülfanın *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)'nın farklı evrelerindeki çeşitli dokularında (tüm vücut, orta bağırsak, hemolenf, yağ doku, kutikula) GST aktivitesi incelenmiş ve aktivitenin yağ dokuda en yüksek olduğu, yumurta evresinde en düşük, larva, pup ve ergin evreye doğru yükseldiği ortaya çıkarılmıştır (Rajurkar et al., 2003).



Şekil 8. Niklozamidın *G. mellonella* orta bağırsağında GST aktivitesine etkisi. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P > 0,05$ (LSD testi).

Larval dönemde besinle alınan farklı konsantrasyonlardaki niklozamidın *G. mellonella*'nın yaşama oranı, gelişme süresi, eşey oranı, ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı üzerindeki olumsuz etkileri bu antibiyotikğin orta bağırsakta oluşturduğu oksidatif stresten kaynaklanabilir. Bu amaçla böceğin orta bağırsak dokusunda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyon seviyesi ile GST aktivitesindeki değişimler tespit edilmiş ve böylece böceğin bazı biyolojik özellikleri üzerindeki etki mekanizmasının oksidatif stres ile ilişkisinin biyokimyasal ve fizyolojik temelleri ortaya konmaya çalışılmıştır. Ayrıca, bu çalışmada *G. mellonella* larvaları kullanılarak niklozamidın in vivo olarak insektisit etkisi araştırılmış ve niklozamidın yüksek konsantrasyonlarda insektisit olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Teşekkür

Yapılan bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek BAP/2012-10-06-10 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Yararlanılan Kaynaklar

Aktümsek, A. 1996. Parazitoid, *Itopectis maculator* F. (Hymenoptera: Ichneumonidae)'un yağ asiti bileşimine konak ve eşey farklılığının etkisi. Turkish Journal of Zoology, 20: 7-10.

- Altınççek, B., M. Linder, D. Linder, K.T. Preissner & A. Vilcinskas, 2007. Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infection and Immunity*, 75: 175-183.
- Alverson, J. & A.C. Cohen, 2002. Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*, 95: 256-260.
- Barr, D.B., R. Allen, O.A. Olsson, R. Bravo, L.M. Caltabiano, A. Montesano, J. Nguyen, S. Udunka, D. Walden, R.D. Walker, G. Weerasakera, Jr.R.D. Whitehead, S.E. Schober & L.L. Needham, 2005. Concentrations of selective metabolites of organophosphorous pesticides in the United States population. *Environmental Research*, 99: 314-326.
- Barwal, R.N. & R.L. Karla, 2001. Changes in the lipid of rust-red flour beetle, *Tribolium castaneum* herbst. on their exposure to dieldrin. *Journal of Applied Zoological Research*, 12: 60-63.
- Bozkurt, K., 2003. Phospholipid and triacylglycerol fatty acid compositions from various development stages of *Melanogryllus desertus* Pall. (Orthoptera: Gryllidae). *Journal of Cell Biology*, 27: 73-78.
- Bronskill, J., 1961. A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *Journal of the Lepidopterists' Society*, 15: 102-104.
- Büyükgüzel, E. & Y. Kalender, 2007. Penicillin-induced oxidative stress: Effects on antioxidative response of midgut tissues in larval instars of *G. mellonella*. *Journal of Economic Entomology*, 100: 1533-1541.
- Büyükgüzel, E. & Y. Kalender, 2008. *Galleria mellonella* (L.) survivorship, development and protein content in response to dietary antibiotics. *Journal of Entomological Science*, 43: 27-40.
- Büyükgüzel, E., 2009. Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion. *Journal of Economic Entomology*, 102: 152-159.
- Büyükgüzel, K. & E. İçen, 2004. Effects of gyrase inhibitors on the total protein content of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet. *Journal of Entomological Science*, 39: 108-116.
- Büyükgüzel, K. & Ş. Yazgan, 1996. Bazı antibiyotiklerin endoparazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nin yaşama ve gelişimine etkileri. *Doğa Turkish Journal of Zoology*, 20: 1-7.
- Büyükgüzel, K. & Yazgan, Ş., 2002. Effects of antimicrobial agents on survival and development of larvae of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) reared on an artificial diet. *Turkish Journal of Zoology*, 26: 111-119.
- Büyükgüzel, K., 2001. DNA gyrase inhibitors: Novobiocin enhances the survival of *Pimpla turionellae* larvae reared on an artificial diet but other antibiotics do not. *Journal of Applied Entomology*, 125: 583-587.
- Büyükgüzel, K., 2001a. Positive effects of some gyrase inhibitors on survival and development of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology*, 94: 21-26.
- Büyükgüzel, K., 2006. Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: effect on adult emergence, longevity, fecundity, and oxidative and antioxidative response of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Economic Entomology*, 99: 1225-1234.
- Chamberlain, W.F. & P.J. Schol, 1991. New procedures to enhance survival of third instar *Hypoderma lineatum* (Villers) (Diptera: Oestridae) in artificial media. *Journal of Medical Entomology*, 82: 266-269.
- Cohen, E., H. Podoler & M. El-Hamlawi, 1988. Effect of malathion-bait mixture on two parasitoids of the Florida red scale, *Chrysomphalus aonidum*. *Crop Protection*, 7: 91-94.
- Conradt, L., S.A. Corbet, T.J. Roper & E.J. Bodsworth, 2002. Parasitism by the mite *Trombidium brevi* on four U.K. Butterfly Species. *Ecological Entomology*, 27: 651-659.
- Croft, B.A., 1990. *Arthropod Biological Control Agents and Pesticide*. Wiley-Interscience, New York. pp.723.
- Dadd, R.H., 1985. "Nutrition: Organisms, 313-390". In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Eds.: G.A. Kerkut & L.I. Gilbert). Pergamon Press, Oxford.
- Damien, C., V.H. Chantal, S. Pirouz, F.H. Zerimech, J. Laurence & M.H. Jean, 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.

- Dean, R.T., S. Fu, R. Stocker & M.J. Davies, 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Journal of Biochemistry*, 324: 1-18.
- Dettbarn, W.F., D. Milatovic & R.C. Gupta, 2006. "Oxidative Stress in Anticholinesterase-Induced Excitotoxicity, 511–532". In: *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds* (Ed.: R.C. Gupta). Elsevier, Amsterdam..
- Ding, Y., N. Hawkes, J. Meredith, P. Eggleston, J. Hemingway & H. Ranson, 2005. Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 387: 879-888.
- Dulhunty, A., P. Gage, S.Curtis, G. Chelvanayagam & P. Board, 2001. The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator, *Journal of Biological Chemistry*, 276: 3319-3323.
- Ergin, E., A. Er, F. Uçkan & D.B. Rivers, 2007. Effect of cypermethrin exposed hosts on eggadult development time, number of offspring, sex ratio, longevity, and size of *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae). *Belgian Journal of Zoology*, 137: 27-31.
- Evans, P., L. Lyras & B. Halliwell, 1999. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods in Enzymology*, 300: 145-156.
- Felton, G.W. & C.B. Summers, 1995. Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29: 187-197.
- Fitzpatrick, G.E. & R.V. Dowell, 1981. Survival and emergence of citrus black fly (*Aleurocanthus woglumi*) parasitoids after exposure two insecticides. *Environmental Entomology*, 10: 728-731.
- Gaaboub, I. A. & M.R. Dawood, 1974. Effects of sublethal concentrations of DDT and malathion on the fecundity and reproduction of culex pipiens I. *Zeit. Ang. Entomology*, 22: 435-443.
- George, P.J.E., J. Kannag & D.P. Ambrose, 2002. Nutritional influence of prey on the biology and biochemistry in *Rhynocoris marginatus* (Heteroptera: Reduviidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 16: 1-4.
- Giordano G., Z. Afsharinejad, M. Guizzetti, A. Vitalone, T.J. Kavanagh & L.G. Costa, 2007. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 219:181-189.
- Grover, J. K., V. Vats, G. Uppal & S. Yadav, 2001. Anthelmintics: a review, *Trop. Gastroenterology*, 22: 180-9.
- Gülbahar, Ö., 2007. Protein oksidasyonun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilgisi. *Turkish Journal of Geriatrics*, 10: 43-48
- Gündüz, N.E.A. & A. Gülel, 2005. Ergin yaşı ve konukçu türünün parazitoit *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae)' un gelişme süresine etkisi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20: 31-36.
- Habig, W. H., M.J. Pabst & W.B. Jakoby, 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Halley B.A., T.A. Jacob & A.Y.H. Lu, 1989. The environmental impact of the use of ivermectin. *Environmental effects and fate. Chemosphere*, 18: 1543-1563.
- Hermes-Lima, M. & T. Zenteno-Savín, 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology*. 133: 537-56.
- Hill, T.A. & R.E. Foster, 2000. Effect of insecticides on the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and its parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Economic Entomology*, 93: 763-768.
- Hirose, E., A.R. Panizzi & A.J. Cattelan, 2006. Potential use of antibiotic to improve performance of laboratory-reared *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 35: 279-281.
- Imperi, F., F. Massai, C. Ramachandran Pillai, F. Longo, E. Zennaro, G. Rampioni, P. Visca, & L. Leoni, 2013. New life for an old drug: the Anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57: 996-1005.
- Inglis, G.D. & A.C. Cohen, 2004. Influence of antimicrobial agents on the spoilage of a meat-based entomophage diet. *Journal of Economic Entomology*, 97: 235-250.
- Ito, K. & T. Nakata, 1998. Diapause and survival in winter in two species of predatory bugs, *Orius sauteri* and *O. minutus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89: 271-276.

- Ito, K., 1989. Studies on the life history of *Cletus punctiger* Dallas (Heteroptera: Coreidae) with special reference to the seasonal interhabitat movements and mechanism of migration into rice fields. Bull. National Agricultural Research Center, 14: 39-103.
- İçen, E., F. Armutçu, K. Büyükgüzel & A. Gürel, 2005. Biochemical stress indicators of greater wax moth *Galleria mellonella* L. exposure to organophosphorus insecticides. Journal of Economic Entomology, 98: 358-366.
- Jain, S.K. & S.N. Levine, 1995. Elevated lipid peroxidation and vitamin E-Quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. Free Radical Biology & Medicine, 18: 337-341.
- Jayaraj, S., P. Ehrhardt & H. Schmutterer, 2008. The effect of certain antibiotics on reproduction of the black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. Annals of Applied Biology, 59: 13-21.
- Jones, W. A., M A Ciomperlik & D A Wolfenbarger, 1998. Lethal and sublethal effects of insecticides on two parasitoids attacking *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). Biological Control, 11: 70-76.
- Joyce, S.A. & C.G.M. Gahan, 2010. Molecular pathogenesis of listeria monocytogenes in the alternative model host *Galleria mellonella*. Microbiology, 156: 3456-3468.
- Kanaoka, Y., K. Fujimori, R. Kikuno, Y. Sakaguchi, Y. Urade, & O. Hayaishi, 2000. Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase: conservation of the ancestral genomic structure of sigma-class glutathione S-transferase. European Journal of Biochemistry, 267: 3315-3322.
- Kostaropoulos, I., A.I. Papadopoulos, A. Metaxakis, E. Boukouvala & E. Papadopoulou-Mourkidou, 2001. Glutathione-S-transferase in the defence against pyrethroids in insect. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 31: 313-319.
- Krishnan, N. & D. Kodrik, 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress. Journal of Insect Physiology, 52: 11-20.
- Krishnan, N., D. Kodrik, B. Kludkiewicz & F. Sehnal, 2009. Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 39: 180-188.
- Lemos, W.P., F.S. Ramalho, J.E. Serrao & J.C. Zanuncio, 2003. Effects of diet on development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), a predator of the cotton leafworm. Journal of Applied Entomology, 127: 389-395.
- Levine, R.L., J.A. Williams, E.R. Stadtman & E. Shacter, 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymology, 233: 347-357.
- Lowry, O.H., N.L. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 19: 265-275.
- Macri, A., V. Stazi & G. Dojmi di Delupis, 1988. Acute toxicity of furazolidone on *Artemia salina*, *Daphnia magna* and *Culex pipiens molestus* larvae. Ecotoxicology and Environmental Safety, 16: 90-94.
- Miyata, S., M. Casey, D.W. Frank, F.M. Ausubel & E. Drenkard, 2003. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Infection and Immunity, 71: 2404-2413.
- Monteiro, D.A., J.A. de Almeida, F.T. Rantin & A.L. Kalinin, 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 143: 141-149.
- Morgan, M.K., L.S.Sheldon, C.W. Croghan, P.A. Jones, G.L. Robertson, J.C. Chuang, N.K. Wilson & C.W. Lyu, 2005. Exposures of preschool children to chlorpyrifos and its degradation product 3,5,6, - trichloro-2-pyridinol in their everyday environments. Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology, 15: 297-309.
- Mukanganyama, S., C.C. Figueroa, J.A. Hasler, & H.M. Niemeyer, 2003. Effects of DIMBOA on detoxification enzymes of the aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae). Journal of Insect Physiology, 49: 223-229.
- Mukherjee, K., B. Altincicek, T. Hain, E. Domann, A. Vilcinskis & T. Chakraborty, 2010. *Galleria mellonella* as a model system for studying listeria pathogenesis. Applied and Environmental Microbiology, 76: 310-317.

- Mullens, B.A. & J.L. Rodriguez, 1992. Effects of disodium octaborate tetrahydrate on survival, behavior, and egg viability of adult muscoid flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 85: 137-143.
- Otitoju, O. & I.N.E. Onwurah, 2007. Glutathione S-transferase (GST) activity as a biomarker in ecological risk assessment of pesticide contaminated environment. *African Journal of Biotechnology*, 6: 1455-1459.
- Özalp, P. & İ. Emre, 1998. Karbohidratların *Pimpla turionellae* L. ergin dişilerinde total glikojen ve protein miktarına etkileri. *Turkish Journal of Biology*, 22: 15-19.
- Özparlak, H., 2003. Böceklerde kutikulanın yapısı, deri değiştirme ve diflubenzuron'un (dfb) etkileri. *S.Ü. Fen-Edb. Fakültesi Fen Dergisi*, 21: 7-19.
- Pearson, B. & A.F. Raybould, 1998. The effects of antibiotics on the development of larvae and the possible role of bacterial load in caste determination and diapause in *Myrmica rubra* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 31: 77-90.
- Pullin, A., 1992. Diapause metabolism and changes in carbohydrates related to cryoprotection in *Pieris brassicae*. *Journal of Insect Physiology*, 38: 319-327.
- Rajurkar, R.B., Z.H. Khan & G.T. Gujar, 2003. Studies on levels of glutathione-S-transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. *Current Science*, 85: 1355-1360.
- Sak, O., E.E. Gülgönül & F. Uçkan, 2009. Effects of cypermethrin exposed to host on the developmental biology of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102: 288-294.
- Seyoum, E., R.P. Bateman & A.K. Charnley, 2002. The effect of *Metarhizium anisopliae* var *aeridium* on haemolymph energy reserves and flight capability in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Applied Entomology*, 126: 119-124.
- Sheehan, D., G. Meade, V.M. Foley & C.A. Dowd, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360: 1-16.
- Simon, L.M., K. Laslo, M. Kotorman, A. Vertesi, K. Bagi, & J. Nemcsok, 1999. Effects of synthetic pyrethroids and methidation on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Environmental Science and Health, Part B.*, 34: 819-828.
- Singh, S.P., J.A. Coronella, H. Benes, B.J. Cochrane & P. Zimniak, 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *European Journal of Biochemistry*, 268: 2912-2923.
- Snedecor, G.S. & W.G. Cochran, 1989. *Statistical Method*. Iowa State University Press, 8th ed., Ames, IA.
- Socha, R., J. Sula & R. Zemek, 1998. Feeding behaviour, digestive physiology and lipid content in macropterous females of *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Physiological Entomology*, 23: 91-96.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122: 617-657.
- SPSS, 1997. *User's manual*, version 10. SPSS, Chicago, IL.
- Şanlı, Y. & S. Kaya, 1994. *Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağlık Seçenekleri Kitabı*, 2.Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, s. 651-669.
- Şeker, D.A. & A. Yanıkoğlu, 1999. *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nın açlık, beslenme, parazitlenme ve yaşlılık durumlarında glikojen seviyesindeki değişimler. *Turkish Journal of Zoology*, 23: 289-296.
- Takada, Y., S. Kawamura & T. Tanaka, 2001. Effects of various insecticides on the development of the egg parasitoid *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Economic Entomology*, 94: 1340-1343.
- Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis & M. Scoullou, 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 178-189.
- Vijayaraghavan, C. & K.C. Chitra, 2002. Total protein and free amino acid content of *Spodoptera litura* (Fab.) due to botanicals and conventional insecticides. *Indian Journal of Entomology*, 64: 92-95.

- Vontas, J.G., G.J. Small & J. Hemingway, 2001. Glutathione-S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357: 65-72.
- Wang, A.H., J.C. Wu, Y.S. Yu, J.L. Liu, J.F. Yue & M.Y. Wang, 2005. Selective insecticide-induced stimulation on fecundity and biochemical changes in *Tryporyza incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 98: 1144-1149.
- Warburg, M.S. & B. Yuval, 1996. Effects of diet and activity on lipid levels of mediterranean fruit flies. *Physiological Entomology*, 21: 151-158.
- Willrich, M.M. & D.J. Boethel, 2001. Effects of diflubenzuron on *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoid *Copidosoma floridanum* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Environmental Entomology*, 30: 794-797.
- Xu, J., A.M. Shelton & X. Cheng, 2001. Comparison of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and *Microplitis plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) as biological control agents of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): field parasitism insecticide susceptibility, and host-searching. *Journal of Economic Entomology*, 94: 14-20.
- Yang, L.K., H.N. Nigg, S.E. Simpson, L.E. Ramos, N.W. Cuyler, J.I. Barnes & C.G. Gren, 2000. Sodium tetraborate effects on mortality and reproduction of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 93: 1485-1492.
- Yanikoğlu, A. 1985. *Schistocerca gregaria* Forskal (Orthoptera: Acrididae) nimflerinin doğal ve sentetik besinde gelişimi sırasında glikojen miktarı tayini. *Doğa Bilim Dergisi*, 9: 582-592.
- Yu, Q., S. Fang, W. Zuo, F. Dai, Z. Zhang & C. Lu 2011. Effects of organophosphate phoxim exposure on certain oxidative stress biomarkers in the silkworm. *Journal of Economic Entomology*, 104: 101-106.
- Yu, S.J., 1993. Induction of detoxification enzymes in phytophagous insects: Roles of insecticide synergists, larval age, and species, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 24: 21-32.
- Yu, S.J., 1996. Insect glutathione-S-transferase, *Zoological Studies*, 35: 9-19.
- Yu, S.J., 2004. Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80: 113-122.
- Zettler, J.L. & G. L. LeCato, 1974. Sublethal doses of malathion and dichlorvos: Effects on fecundity of the black carpet beetle. *Journal of Economic Entomology*, 67: 19- 21.

