



ENDOPARAZİTOİT *Pimpla turionellae* L.
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) VENOMUNUN
BÖCEK VE MEMELİ HÜCRELERİNDE
TOKSİKOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Selin ÇİM

Eskişehir, 2018

ENDOPARAZİTOİT *Pimpla turionellae* L.
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) VENOMUNUN
BÖCEK VE MEMELİ HÜCRELERİNDE
TOKSİKOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Selin ÇİM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe AK CAN

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kasım, 2018

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1707F458 no.'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Selin Çim'in "Endoparazitoit *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Venomunun Böcek ve Memeli Hücrelerinde Toksikolojik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi 23/11/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ	
Üye	: Doç. Dr. Eylem AKMAN GÜNDÜZ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ	


Prof. Dr. Ersin YÜCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

ENDOPARAZİTOİT *Pimpla turionellae* L. (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) VENOMUNUN BÖCEK VE MEMELİ HÜCRELERİNDE TOKSİKOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Selin ÇİM

Biyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kasım, 2018

Danışman: Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe AK CAN

Bu çalışmada idiobiont, soliter, pup endoparazitoiti *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae)'nın, venomunun sublethal dozlarının konak böcek *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae) pupları üzerindeki genotoksik ve oksidatif etkileri ile C6 glioblastoma memeli hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri belirlendi. *P. turionella* dişilerinden izole edilen venomunun glioblastoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin olduğu MTT ve Alamar Blue analizleri ile test edildi. Parazitoit venomunun konak puplarına enjeksiyonu ile venomun sublethal dozları ve süreleri tespit edildi. Belirlenen venom doz ve inkübasyon sürelerine göre konak hemolenfinde antioksidan enzim aktivite ve lipid peroksidasyonundaki değişimler analiz edilirken hemositlerdeki genotoksik hasar COMET ve Mikronukleus (MN) analizleri ile belirlendi. Çalışma sonuçlarına göre *P. turionellae* venomuna maruz kalan *G. mellonella* puplarında antioksidan enzim aktivitelerinin ve lipid peroksidasyonunun kontrole göre azalma gösterdiği, aynı venom dozlarının konak hemositlerinde ise genomik hasarı arttırdığı tespit edildi. Sonuç olarak bu çalışma endoparazitoit venomunun, hem konak hemde memeli hücrelerinde sitotoksik etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: *Pimpla turionellae*, Venom, MTT, Glioblastoma, Antioksidan enzim, Genotoksisite, *Galleria mellonella*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE TOXICOLOGICAL EFFECTS OF ENDOPARASITOID *Pimpla turionellae* L. (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) VENOM ON INSECT AND MAMMALIAN CELLS

Selin ÇİM

Department of Biology

Eskişehir Technical University, Graduate School of Sciences, November, 2018

Supervisor: Asoc. Prof. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

Co-supervisor: Dr. Ayşe AK CAN

In this study, the genotoxic and oxidative effects of sublethal doses of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae) venom on host insect *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae), and cytotoxic effects of the venom on C6 glioblastoma mammalian cell line were determined. The cytotoxic effects of venom isolated from *P. turionella* females on glioblastoma cells were determined by MTT and Alamar Blue tests. Sublethal doses and times of venom were determined by injection of parasitoid venom to host pupae. According to the venom doses and incubation times, changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in hemolymph of the host pupae were analyzed and also genotoxic damage in hemocytes of pupae was determined by COMET and Micronucleus (MN) assays. According to the results of the study, the antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *G. mellonella* pupae exposed to *P. turionellae* venom decreased when compared with control and genomic damage in host hemocytes increased at all venom doses. In conclusion, this study shows that endoparasitoid venom has cytotoxic effects on host and mammalian cells.

Anahtar Sözcükler: *Pimpla turionellae*, Venom, MTT, Glioblastoma, Antioxidant enzyme, Genotoxicity, *Galleria mellonella*

TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum tez çalışmaları süresince, her daim bilgi, tecrübe ve deneyimleri ile yanımda olan, akademik anlamda ilerleme ve gelişme kaydetmeme yardımcı olan, saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Üstümdeki emekleri tartışılmaz bir gerçektir.

Her insanın tecrübe etme şansı bulamayacağı bazı hayalleri vardır; deneylerini Türkiye'nin en iyi üniversitelerinden birinde yapmak gibi, bunun gerçekleşmesini sağladığı ve bütün deneyim ve tecrübelerini benimle paylaştığı için ikinci danışmanım Ayşe AK CAN'a sonsuz teşekkürler ediyorum

Çalışmalarım içerisinde yer alan deneylerde bana yardımcı olan çok değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Emine DUMAN'a ve çalışmalarım süresince aynı laboratuvar ortamını paylaştığım, gerektiğinde yardımlarını benden esirgemeyen, ortak hayallere sahip olduğum, değerli arkadaşım Aycan ÖNER'e ve Uganda'dan gelip son bir senemi neşelendiren çalışma arkadaşım Rehemah GWOKYALYA'ya sonsuz teşekkür ederim.

İnsanın beraber düşünüp, sorular sorup, tartışabileceği birine sahip olması mükemmel bir şanstır. Halil İbrahim AKBAŞ'a bana düşünüp, üretme konusunda her zaman verdiği teşvikler için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni büyük bir özveri ile yetiştiren, maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, zor günlerimizi hep beraber atlattığımız aile üyelerim, sevgili annem Nurten ÇİM'e, canım kardeşlerim Sibel OĞUZ, S. Ahmet OĞUZ, Uğur ÇİM'e ve biricik yeğenim Toprak OĞUZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak hergün eksikliğini ve acısını hissetmek zorunda olduğum, en büyük zorluğum, boğazıma takılan yumrum, canım babam Arif ÇİM... Hafızamda bıraktığın mükemmel anılar ve bana kattığın çalışma sevgisi için sana hep minnettar kalacağım... Bu satırları asla okuyamayacaksın ama sen okuyamasan da ismin sonsuza kadar burada yazacak, çünkü sen bir topraktan çok daha fazlasısın... Dünya'ya gelmemi sağladığın için teşekkürler.

Selin ÇİM

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.



Selin ÇİM

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GÖRSELLER DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Böceklerde Antioksidan Savunma Sistemi	13
1.2. Genotoksisite.....	19
1.3. Konak ve Endoparazitoitin Sistematikteki Yeri.....	21
1.3.1. <i>Galleria mellonella</i> Linnaeus, 1758 (Büyük Balmumu Güvesi).....	21
1.3.2. <i>Pimpla turionellae</i> Linnaeus, 1758.....	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
2.1. Parazitoit ve Konak Kültürlerinin Kurulması	26
2.2. Venom Eldesi ve Saklanması	27
2.3. Total Protein Analizi	28
2.4. Hücre Kültürü	28
2.4.1. MTT Analizi.....	29
2.4.2. Alamar Blue Assay.....	30

2.5. <i>P. turionellae</i> Venomunun Konak Böcek Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	30
2.5.1. <i>P. turionellae</i> Venomunun Konak Böcekte Lethal ve Sublethal Dozlarının Belirlenmesi.....	30
2.5.2. <i>P. turionellae</i> Venom Uygulamasına Bağlı Konak Böcekteki Lethal Zamanının Belirlenmesi	31
2.5.3. Venomun Sublethal Dozlarının Konak Puplarına Uygulaması ve Hemolenf Toplama	31
2.5.4. COMET Assay (Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) Yöntemi) ...	31
2.5.5. Mikronukleus Assay	32
2.6. Venom Sublethal Dozlarının ve Parazitlemenin Konakta Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi.....	33
2.6.1. Venomun Konak Puplarına Uygulanması, Hemolenf Toplama ve Homojenizasyon	33
2.6.2. Protein Miktar Tayini.....	34
2.6.3. Katalaz	35
2.6.4. Glutatyon S Transferaz	35
2.6.5. Süperoksitdismutaz	36
2.6.6. Malondialdehit	38
2.7. İstatistik	39
3. BULGULAR	41
3.1. Hücre Kültürü	41
3.1.1. MTT Analizi	41
3.1.2. Alamar Blue Analizi	43
3.2. <i>P. turionellae</i> Venomunun Konak Böcek Üzerine Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	44
3.2.1. <i>P. turionellae</i> Venomunun Konak Böcekte Lethal-Sublethal Dozların ve Lethal Zamanın Belirlenmesi.....	44

3.2.2. COMET Assay (Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) Yöntemi) ...	46
3.2.3. Mikronukleus Assay	51
3.3. <i>P. turionellae</i> Venom Dozlarının Konak <i>G. mellonella</i> Hemolenfinde Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkisinin Belirlenmesi	53
3.3.1. Pupal Hemolenfte Total Protein Miktarının Belirlenmesi.....	53
3.3.2. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi	53
3.3.3. Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi	54
3.3.4. Süperoksitdismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi	55
3.3.5. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi.....	56
3.4. Parazitlemenin Konak Pup Hemolenf Protein Miktarı ve Enzim Aktivitelerine Etkisi.....	56
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	60
KAYNAKÇA	72
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. <i>Galleria mellonella</i> yarı sentetik besiyeri	27
Tablo 2. 2. Katalaz aktivite ölçümü bileşenleri.....	35
Tablo 2. 3. Glutasyon-S-transferaz aktivite ölçümü bileşenleri	36
Tablo 2. 4. Süperoksit dismutaz aktive ölçümü bileşenleri (1 adet mikropate kuyucuğu için)	38
Tablo 3. 1. <i>P. turionellae</i> venom dozlarının C6 glioblastoma hücre canlılığı üzerine etkileri (4. ve 24. saat).....	42
Tablo 3. 2. <i>P. turionellae</i> venom dozlarının C6 glioblastoma hücre proliferasyonu üzerine etkileri (4. ve 24. saat)	44
Tablo 3. 3. Farklı dozlarda venom uygulanan <i>G. mellonella</i> pupal evresinde lethal dozlar (LD ₅₀)	45
Tablo 3. 4. Venom dozuna bağlı pupal MUC, ergin olma süresi ve oranı	46
Tablo 3. 5. Kuyruk boyundaki doz ve saatlere bağlı değişimler	48
Tablo 3. 6. Kuyruk yoğunluğundaki doz ve saatlere bağlı değişimler	49
Tablo 3. 7. Kuyruk momentindeki doz ve saatlere bağlı değişimler	50
Tablo 3. 8. Kuyruk göçündeki doz ve saatlere bağlı değişimler	51
Tablo 3. 9. <i>G. mellonella</i> pupalarına farklı dozlarda uygulanan venoma bağlı olarak hemositlerde mikronukleus oluşumunda görülen değişimler.....	52
Tablo 3. 10. <i>P. turionellae</i> venomunun <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenf protein miktarına etkileri.....	53
Tablo 3. 11. <i>P. turionellae</i> venomunun <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenfindeki KAT aktivitesine etkileri.....	54
Tablo 3. 12. <i>P. turionellae</i> venomunun <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenfindeki GST aktivitesine etkileri.....	55
Tablo 3. 13. <i>P. turionellae</i> venomunun <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenfindeki SOD aktivitesine etkileri.....	55
Tablo 3. 14. <i>P. turionellae</i> venomunun <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenfinde MDA aktivitesine etkileri.....	56
Tablo 3. 15. Parazitlemenin <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenfindeki Protein miktarına etkileri	57
Tablo 3. 16. Parazitlemenin <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenfindeki Katalaz aktivitesine etkileri.....	57

Tablo 3. 17. Parazitlemenin <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenfindeki MDA aktivitesine etkileri	58
Tablo 3. 18. Parazitlemenin <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenfindeki SOD aktivitesine etkileri	58
Tablo 3. 19. Parazitlemenin <i>G. mellonella</i> 'nın pupal hemolenfinde MDA miktarına etkileri	59



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. BSA ile oluşturulan protein standart eğri grafiği	34
Şekil 2. 2. SOD standart eğri grafiği	37
Şekil 2. 3. MDA standart grafiği.....	39
Şekil 3. 1. Farklı zaman dilimlerinde (4 ve 24. saat) uygulanan <i>P. turionellae</i> venom dozlarının C6 glioblastoma hücre canlılığı üzerine etkileri (MTT analizi)	42
Şekil 3. 2. Farklı zaman dilimlerinde (4 ve 24. Saat) uygulanan <i>P. turionellae</i> venom dozlarının C6 glioblastoma hücre proliferasyonu üzerine etkileri (Alamar Blue analizi)	43



GÖRSELLER DİZİNİ

Görsel 1. 1. Uçkan (1999) tarafından bildirilen <i>P. turionellae</i> ovipozitörünün lateral görüntüsü (st7: sternit (karın plağı), t7, t8: 7. ve 8. tergite (sırt plağı), v: valvula (ovipozitör).....	2
Görsel 1. 2. Uçkan (1999) tarafından bildirilen <i>P. turionellae</i> venom aparatları, venom kesesi ve dufour bezi v2,v3: valvulalar; vr1, vr2, vrp: valviferler; Dgl: dufour bezi tübülleri; pgl: venom bez tübülleri; ps: venom kesesi pc: venom kanalı	2
Görsel 1. 3. Süperoksit dismutaz enzim reaksiyonu.....	16
Görsel 1. 4. Katalaz enzim reaksiyonu	17
Görsel 1. 5. Glutasyon peroksidaz enzim reaksiyonu	17
Görsel 1. 6. Merkaptürük asitin oluşum süreci. X, GSH ile konjugasyon yapan ksenobiyotiği göstermektedir	18
Görsel 1. 7. Konak <i>G. mellonella</i> pup (Kwadha vd., 2017) ve ergin bireyi. a: dişi, b: erkek.....	23
Görsel 1. 8. Parazitoit <i>P. turionellae</i> 'nin larva, pupa ve ergin dönemleri (♀♂).....	25
Görsel 2. 1. <i>P. turionellae</i> a,b: parazitleme yapan ergin birey, c: besin.....	26
Görsel 2. 2. <i>G. mellonella</i> a: ergin bireylerden oluşturulan kültür, b: larvaların yetiştirildiği kavonozlar, c,d: puplaşmanın sağlandığı kağıt bulunan kavonozlar	27
Görsel 2. 3. <i>P. turionellae</i> venom kesesi	28
Görsel 3. 1. COMET analizine ait SYBR Green ile boyanmış <i>G. mellonella</i> pupal hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri: DNA hasarı olmayan hemositler	47
Görsel 3. 2. COMET analizine ait SYBR Green ile boyanmış <i>G. mellonella</i> pupal hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri: DNA hasarı olan küçük baş ve yelpaze kuyruğa sahip hemositler.	47
Görsel 3. 3. Hemositlerin ve mikronukleusların Giemsa boyama yöntemi ile elde edilen mikroskobik görüntüsü (100X objektif)	52

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
Aag2	: <i>Aedes aegypti</i> (L.) (Diptera: Culcidae) larva hücresi
aKRT	: Anti-kalretikulin (kalretikulinin inhibitörü)
ANOVA	: Varyans analizi
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Bovin serum albumin
BTI-TN-5B1-4	: <i>Trichoplusia ni</i> embriyo hücreleri
C6	: Rat glioblastoma hücreleri
Ca ⁺²	: Kalsiyum iyonu
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CO ₂	: Karbondioksit
COMET	: Tek Hücre Jel Elektroforezi
dak	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
g	: Gram
GABA	: Gama-aminobütrik asit
GBM	: Glioblastoma multiforme
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Oksitlenmiş glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz

H	: Hidrojen
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
HBSS	: Hanks dengeli tuz solüsyonu
HCl	: Hidroklorik asit
Hepes	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
K ⁺	: Potasyum iyonu
KAT	: Katalaz
KCl	: Potasyum klorür
LD ₅₀	: Ortalama lethal doz
LD ₉₉	: Lethal doz
LMPA	: Düşük kaynama dereceli agaroz
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MMP	: Matriks metalloproteazların
MN	: Mikronukleus
mRNA	: Mesajcı RNA
Na ⁺	: Sodyum iyonu
NAADP-R	: Nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B

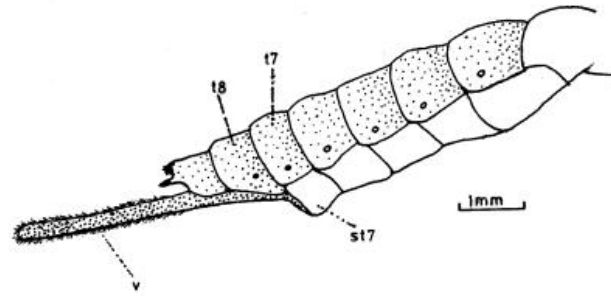
nm	: Nanometre
NMA	: Normal kaynama dereceli agaroz
O ₂	: Moleküler oksijen
PBS	: Fosfat tamponu
PTU	: Feniltiyoüre
RYR1	: Ryanodin (kafein agonisti)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Sf21	: <i>Spodoptera frugiperda</i> hücreleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Süperoksit radikali
TBA	: Tiyoarbütirik asit
TC100	: Hücre kültürü medyum
XOD	: Ksantin oksidaz
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

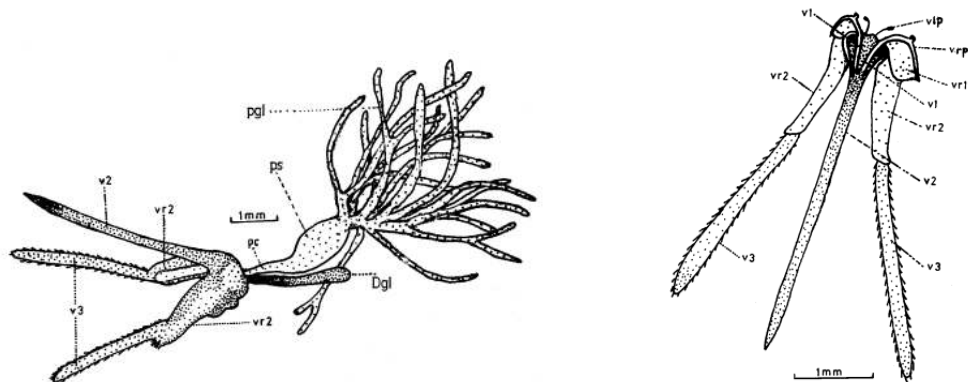
Hymenoptera ordosuna ait parazitoit yaban arıları, zararlı konak popülasyonların baskılanmasında etkili, risksiz, spesifik etki gösteren kontrol ajanlarıdır. Tipik olarak, dişi yumurtalarını konak (çoğunlukla arthropodlar) içerisine (endoparazitoit) veya dışarısına (ektoparazitoit) bırakır ve açılan yumurtadan çıkan parazitoit larvası konaktan beslenerek hayatını devam ettirir. Ovipozisyonundan önce konağa verilen bileşenlerle konağını öldüren veya felç ederek gelişimini durduranlar idiobiont, ovipozisyonundan sonra konağın gelişimine izin veren parazitoitler koinobiont, olarak tanımlanmıştır (Wharton 1993; Godfray, 1994). Beslenme sonucunda konak, parazitoit nedeniyle ölür, ancak konağın hayatta kalabileceği ve çoğalmaya devam edebileceği örnekler de vardır (Dheilly, 2015). Farklı yaşam biçiminin bir sonucu olarak, endoparazitoit ve ektoparazitoitlerin fizyolojik ihtiyaçları ve konak üzerindeki etkileri değişiklik gösterebilir (Pennacchio ve Strand, 2006). Parazitlenme sırasında konağa enjekte edilen bileşenler, venom ve kaliks sıvısı dahil olmak üzere başarılı parazitlenmeyi kolaylaştırmada hayati rol oynar (Tanaka ve Vinson, 1991). Bunlar, özellikle endoparazitoitlerde konak manipülasyonuna katkıda bulunan simbiyotik virüsler veya virüs benzeri partiküller içerebilir veya içermeyebilir. Parazitoit arılardan elde edilen venomlar, protein bakımından zengin bileşenlerden oluşmuş bir kokteyl özelliği taşır. Ektoparazitoit ve endoparazitoit arıların venom içeriklerini belirlemeye odaklanan çeşitli çalışmalar, iki parazitoit yaban arısı grubu arasında birkaç ortak protein bulunduğunu ortaya çıkarırken, venom iki grupta farklı amaçlara hizmet edebilir. Genel olarak, ektoparazitoitin venomları, konak dışındaki ektoparazitik larvaların beslenmesini sağlamak için konak felci (kısa veya uzun vadeli) ile ilgilidir. Buna karşın, endoparazitoitlerin venomları da felce neden olabildikleri gibi, konak bağışıklık sistemine müdahale ederek parazitlenmeyi kolaylaştırmak ve bırakılan yumurtanın gelişimini sağlamak amacıyla konağa bırakılan venom dışı diğer faktörlerin etkilerini (örneğin polidnavirüsler, PDV'ler) sinerjik hale getirir (Vinson, 1990; Digilio vd., 1998; Parkinson ve Weaver, 1999; Parkinson vd., 2002; Parkinson vd., 2004; Krukova vd., 2007; Kryukova vd., 2011; Pennacchio vd., 2014).

Bu tez çalışması kapsamında venom kaynağı olarak kullanılan endoparazitoit, idiobiont ve soliter tür *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişileri erginleştikten yaklaşık 3 - 6 gün sonra konak pupları içine abdomenlerinin sonunda

bulunan ovipozitörleri (Görsel 1.1) yardımıyla yumurta bırakmaya başlarlar. Bu ovipozitör, yalnızca yumurtlamada değil ayrıca ovipozisyondan önce konağı felç etmede de kullanılmaktadır. Yumurtadan çıkan larva felç olan konağın dokularından ve vücut sıvılarından beslenerek larval gelişimini devam ettirmektedir. Yaklaşık 10 gün süren larval dönem sonunda pupal döneme geçmekte ve bu dönemin sonuna doğru ergine ait yapılar belirginleşmektedir. Bu ilişkide *P. turionellae* bireylerinin larval dönemi tamamlamaları konaklarının ölümüyle sonuçlanmaktadır (Yazgan, 1981; Kansu ve Uğur, 1984; Uçkan ve Gülel, 1990). Çok sayıda zararlı lepidopter türünün prepup ve pupunda soliter, idiobiont ve endoparazitoit olarak gelişen bir tür olan *P. turionellae* etkin bir venom kesesi ve içeriğine sahiptir (Görsel 1.2).



Görsel 1. 1. Uçkan (1999) tarafından bildirilen *P. turionellae* ovipozitörünün lateral görüntüsü (st7: sternit (karın plağı), t7, t8: 7. ve 8. tergit (sırt plağı), v: valvula (ovipozitör))



Görsel 1. 2. Uçkan (1999) tarafından bildirilen *P. turionellae* venom aparatları, venom kesesi ve dufour bezi v2,v3: valvulalar; vr1, vr2, vrp: valviferler; Dgl: dufour bezi tübülleri; pgl: venom bez tübülleri; ps: venom kesesi pc: venom kanalı

Parazitlemeyi takiben konağını felç eden ve yaşamını sürdürmesine izin vermeyen *P. turionellae* dişilerinin venomunun, hedef hücrelerde (konak hemositleri) hücre canlılığını ve mitotik aktiviteyi azaltarak enkapsülasyon davranışını engellediği ve bu etkiyi apoptozu tetiklemek suretiyle oluşturduğu gösterilmiştir (Er vd., 2010; Er vd., 2011a; 2011b; Uçkan vd., 2010). Konak parazitoit ilişkisinde hücre ölümü genel bir özelliktir. Bu durum sıklıkla konağın bağışıklık sisteminin baskılanması ile ilişkilidir. Konağa enjekte edilen dişi kaynaklı salgılara ve bunların dozuna bağlı olarak apoptotik veya onkolitik yolların uyarılması sonucu hücre ölümleri olabilir. *Pimpla* cinsine ait her iki türde de (*P. hypochondriaca* ve *P. turionellae*) venomun konak felcini tetiklediği ve bunun sitotoksik ve sitolitik mekanizmalarla gerçekleştiği belirlenmiştir (Parkinson ve Weaver, 1999; Ergin vd., 2006). Ayrıca *P. hypochondriaca* türünün venom içeriğinde konak böcekte felce sebep olan ve pimplin olarak adlandırılan 27 kDa ağırlığında heterodimer bir proteinin varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada Pimplin'in felç edici etkisinin konak sinir-kas sisteminde yer alan mekanizmaların kontrolüyle gerçekleşebileceği ifade edilmiştir (Parkinson vd., 2002). Yapılan bir diğer çalışmada ise, *P. hypochondriaca*'nın venom içeriğinde moleküler ağırlığı 4 - 22 kDa arasında değişen dokuz adet proteinin varlığı gösterilmiştir (Parkinson vd., 2004). Bu proteinlerden ikisinin gen diziliminin örümcek venomlarında da bulunan atrakotoksin ve omega-konotoksin ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Richards ve Parkinson, 2000). Düşük moleküler ağırlıktaki bu proteinlerin Ca^{+2} iyon kanallarında etkili olarak nörotoksik aktivite gösterebilecekleri ifade edilmiştir (Parkinson vd., 2004). *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) hücrelerinde (Sf21) sitotoksik etki gösteren daha küçük bir protein (13 kDa) de bu türün venomundan elde edilmiştir (Parkinson ve Weaver, 1999). *P. hypochondriaca* venomunun sitolitik etkisi domates güvesi, *Lacanobia oleracea* L. (Lepidoptera: Noctuidae) hemositlerinde de görülmektedir (Keenan vd., 2007). Ayrıca, *P. hypochondriaca* venomunda bulunan sitolitik etkili fenoloksidaz ve buna ilaveten laktaz aktiviteleri (Parkinson vd., 2002; Parkinson vd., 2004) *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) venom içeriğinde de belirlenmiştir (Abt ve Rivers, 2007). Daha önce yapılan bir çalışmada ise biyokimyasal ve kromatografik analizler ile içeriği belirlenen ve geniş moleküler ağırlıktaki proteinlerden oluşan, *N. vitripennis* venomu, kültüre alınmış *Trichoplusia ni* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) (BTI-TN-5B1-4) embriyo hücrelerine uygulandığında, plazma ve hücre zarı şişmesini hücre parçalanmasının takip ettiği

gözlenmiştir (Rivers vd., 2006). Buna ilaveten, araştırmacılar daha önce yaptıkları çalışmalar ile venomun mitokondri ve endoplazmik retikulumdan hücre içine kalsiyum akışını, cAMP artışını tetikleyen G proteine bağlı sinyal iletim yollarını kullanarak onkolitik mekanizmalar ile hücre ölümünü gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir (Rivers vd., 2002; Rivers vd., 2005). *P. turionellae* venomunun hedef konak tür (Ergin vd., 2006) ve konak türün hemositleri üzerindeki etkilerinin (Er vd., 2010; Er vd., 2011a; 2011b; Uçkan vd., 2010) yanı sıra hedef konak olmayan farklı böcek türlerine ait hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri de araştırılmıştır (Ergin vd., 2006). Konak tür *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ile yapılan *in vivo* aktivite çalışmalarında, venomun konağın her iki evresi (larva ve pup) üzerinde de etkili olduğu görülmüştür (Ergin vd., 2006). Venomun hedef olmayan hücreler üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile *T. ni* (BTI-TN-5B1-4) embriyo hücresi ve *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culcidae) (Aag2) larva hücresi kullanılmıştır. Her iki tür üzerinde yapılan çalışmalarda hücrelerin şişmeye başlayıp ölümün gerçekleşmesi için uzun saatler geçmiş ve hücre parçalanması en az 48 saat sonra görülmüştür. Sonuçta, hücrelerin yuvarlaklaşması, membranın şişmesi, sitoplazmik uzantıların kaybolması ve nükleer materyalin yoğunlaşması gibi nekroz özellikleri gözlenmiştir. Venomun konak tür üzerindeki morfolojik ve biyokimyasal etkileri yine konak tür *G. mellonella* hemositleri ve konak tür olmayan *T. ni* embriyo hücreleri kullanılarak belirlenmiştir (Keenan vd., 2007). Hemositlerin aksine tüm venom uygulamalarında embriyo hücrelerinde aşırı derecede vakuol oluşumu görülmüştür. İki saat kadar bu artış devam ettikten sonra üçüncü saat sonunda hücrelerin %55'ten fazlası ölmüştür. Aynı çalışmada, hem hemosit hem de hücre kültürüne venom uygulamaları; *P. hypochondriaca* (Parkinson ve Weaver, 1999) ve *N. vitripennis* venomunda da tespit edilen fenoloksidaz enziminin inhibitörü feniltiyoüre (PTU) (Abt ve Rivers, 2007) ve *N. vitripennis* venom içeriği (Asgari vd., 2011) ile *Cotesia rubecula* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae) (Asgari vd., 2011; Zhang vd., 2006) kaliks sıvısında varlığı belirlenen konak hemositlerinin yapışma ve yayılmasını kontrol eden şaperon proteini kalretikulinin inhibitörü anti-kalretikulin (aKRT) kullanılarak da yapılmıştır. Venomun konak ve hücre kültürüne uygulama öncesi PTU ve aKRT ile işlem görmesi konak hemositleri için koruma sağlarken aynı etki *T. ni* embriyo hücrelerinde görülmemiştir. PTU ve aKRT tatbik edilen venom kullanıldığında hemositlerde çok az vakuol oluşumu görülmesi venom içeriğinde fenoloksidaz ve kalretikulinin varlığını göstermiştir. Diğer yandan, venom

tatbik edilen embriyo hücrelerinde hem onkotik hem de apoptotik morfolojik oluşumlar görülmüş, 6 saat içinde hücrelerin sitoplazmik uzantıları kaybolmuş, sitoplazmik büzülmeyi takiben yuvarlaklaşma, küçülme (şişme olmamış) ve vakuol oluşması şeklinde morfolojik değişiklikler meydana gelmiştir (Keenan vd., 2007). Hücre morfolojisinde venomun sebep olduğu değişimler araştırmacıları kalsiyum dengesini araştırmaya yöneltmiştir. Yapılan araştırmada, venom tatbik edilen *T. ni* hücrelerine kalsiyuma duyarlı fluo-4 asetoksimetil uygulanmış ve floresan mikroskop altında hücreler görüntülenmiştir. Sonuç olarak, hücre morfolojisinde görülen değişimlerden önce hücre içi Ca^{+2} seviyesi arttığı görülmüştür (Keenan vd., 2007). Hücre içerisindeki Ca^{+2} artışının kaynağını belirlemek amacı ile de bir dizi araştırma yapılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak hücre içindeki Ca^{+2} artışının kaynağının mitokondri olup olmadığını belirlemek için venom tatbik edilen hücreler mitokondri fonksiyonunu (zardaki geçiş sistemini) engelleyen rodamin 123 ile boyanmış ancak 24 saatlik zaman sürecinde mitokondri zarı potansiyelinde bir değişim meydana gelmemiştir. Hücre içi Ca^{+2} seviyesindeki artışın endoplazmik retikulumdan kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırmak için venom tatbikinden önce hücrelerin ortamına kalsiyum kanalı modülatörleri eklenerek hücre canlılığı incelenmiştir. Bu amaçla; IP3R kanalı engelleyicileri heparin ve ksestospongin, NAADP-R kalsiyum duyarlı kanal engelleyicisi verapamil ve ER'den Ca^{+2} çıkışını uyaran kafeinin agonisti RYR1 (ryanodin) kullanılmıştır. Araştırma sonunda, venomun kontrol ettiği hücre içi Ca^{+2} seviyesindeki artış mekanizmasının NAADP, IP3 ve RyR1 reseptörlerinden bağımsız bir şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Hücre içi Ca^{+2} seviyesindeki artışın hücre dışından kaynaklanabileceği düşünülerek hücre dışı kalsiyumdan yoksun ortamda embriyo hücrelerine venom tatbik edilmiş, bunun için TC-100 hücre kültürü medyumu yerine kalsiyumsuz Hanks dengeli tuz solüsyonu (HBSS) kullanılmıştır. Sonuçta, hücre canlılığında değişim olmamış, kalsiyumdan yoksun ortamda venom tatbik edilen hücrelerin sitoplazmasında da kalsiyum bulunan ortamda yetiştirilenler ile hemen hemen aynı derecede yoğun kalsiyum varlığı tespit edilmiştir. Hücre kültürüne, porlar veya kanallar aracılığı ile hücre dışı çözünmüş maddelerin hücre içine geçişini yavaşlatan ozmotik koruyucular, rafinoz ve süktroz ilavesi de hücre parçalanmasında zaman ve doza bağlı olarak gecikmeler oluşturmuş, fakat ölümü engellenmemiştir. Daha önce yapılan tüm bu çalışmalara rağmen, *P. turionellae* venomunun konak üzerindeki oksidatif ve genotoksik etkilerini belirleyen bir çalışmaya literatürde

rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tez kapsamında yapılan antioksidan enzim aktivite ve genotoksisite analizlerinden elde edilen verilerin venom ve konak hücre etkilşimine ait toksikolojik verilere katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Son yıllarda hayvansal venomların farmakolojik etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar giderek önem kazanmaktadır (Rady vd al., 2017; Khamis vd., 2018). Çeşitli türlerin venomlarında bulunan protein bileşenlerinin anti-karsinojenik aktivite, onkotik litik mekanizmalarla hücre ölümü, yapısal ve farmakolojik özellikleri ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri gibi çeşitli biyolojik işlevleri farklı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Endstrom, 1992; Ikonen, ve Riekkinen, 1999; Gerristen, 2001; Son vd., 2007; Danneels vd., 2014; Sisakht vd., 2017). Ayrıca arı ve yaban arısı gibi Hymenoptera türlerinden elde edilen venomlarda, antimikrobiyal, sitolitik etki gösteren peptitler ve enzimler, düşük moleküler ağırlıklı nörotoksinler bulunmaktadır (Uçkan vd., 2004; Moreau ve Asgari, 2015; dos Santos-Pinto vd., 2018). Çeşitli araştırmacılar, bazı yaban arısının türlerinin venom içeriğinde antimikrobiyal (Čeřovský vd., 2008), antikonvülsan (Cunha vd., 2005) antikoagülan (Han vd., 2008), sitostatik (Liu vd., 2002), sitotoksik, genotoksik ve mutajenik (Hoshina vd., 2013) özellikler gösteren farmakolojik potansiyeli olan maddeler bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Dahası, Sisakht vd., (2017) arı venomunun insan glioblastoma hücreleri üzerinde apoptotik ve sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle biyotoksin kaynaklarından birisi olan böcekler özellikle de hymenoptera takımına ait arılar, venom bileşimlerindeki farklı toksinler, enzimler, büyüme faktörleri, aktivatörler ve inhibitörler gibi biyoaktif moleküller ile alternatif ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalarda özellikle aranan canlılar durumundadırlar. Venom salgılarından elde edilen yüksek oranda konsantre aktif enzimler, sitotoksinler ve nörotoksinler, memeli sinir ve kalp-damar sisteminde hücresel düzeyde çeşitli fonksiyonel ve yapısal özelliklerin belirlenmesinde araç olmuşlardır. Böcek venomları, böceklerin sinir ve kas sistemlerinin çalışmasında da kullanılmıştır. Kısmen az oranda elde edilebildiklerinden kısmen de sosyal kuşkudan dolayı modern tıpta doğrudan kullanılma şansları fazla olmamışsa da, son yıllarda ilerleyen biyokimyasal teknikler sayesinde hızla artan bilgiler doğrultusunda bu gerçek de değişikliğe uğramaya başlamıştır (Schmidt, 1982). Hymenoptera takımına ait türlerin venomları, özellikle bal arısı venomu, romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Endstrom, 1992). Venomun vücut enzim ve bağışıklık sistemlerini

uyararak tedavi özelliği gösterdiği ileri sürülmüştür (D'Epiro ve Lee, 1999; Pereira Santos vd., 2001). Arı venomunun ise sahip olduğu aktif bileşenler sayesinde çeşitli kanser hücreleri üzerinde kalmodulin adlı hücre proliferasyonunda etkin bir proteini bağlayarak hücre büyümesini baskıladığı, kaspazların aktivasyonunu sağlayarak apoptozu uyardığına dair çalışmalar mevcuttur. Ancak, yine de çalışılan hücrelerin farklı olmasına bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir (Heinen ve Gorini da Veiga, 2011). Çeşitli arı venomlarına dair yapılan çalışmalarda da sahip oldukları biyoaktif bileşenlerin sitokrom c salınımına, iyon kanallarının geçirgenliğini bozmasına, nükleer kromatin yoğunluğunun artmasına, hücre döngüsünde yer alan çeşitli proteinlerin mRNA ekspresyonlarını baskılayarak anti-kansinojenik aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Genellikle bal arısı venomu üzerine yapılan bu çalışmalara rağmen, parazitoit hymenopterlerin sahip oldukları venom içeriğinin de biyotoksin kaynağı canlılar arasında değerlendirilmesine yönelik çalışmalar oldukça kısıtlıdır (Danneels vd., 2010). Bu nedenle parazitoit venomlarının farmakolojik etki mekanizmalarının daha fazla çalışılmasına ihtiyaç vardır (Heinen ve Gorini da Veiga, 2011). Bahsedilen bu nedenlerden dolayı bu tez çalışması kapsamında endoparazitoit venomunun belirlenen memeli hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin analiz edilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada venom kaynağı olarak kullanılan endoparazitoit *P. turionellae* dişilerine ait venom bezinin morfolojik ve histolojik yapısı üzerine yapılan çalışmalarda, bez hücrelerinin yapısına bağlı olarak venom içeriğinin protein tabiatında olduğu gösterilmiştir (Uçkan ve Gülel 1990; Uçkan, 1999). Dişilerin venom analizlerinde protein dışında karboksilik asit ve fosforlu bileşiklerin bulunduğu, fakat karbohidratların bulunmadığı ortaya konmuştur (Uçkan ve Gülel, 1990; Uçkan vd., 2004; Uçkan vd., 2006). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda; venom içeriğinin geniş moleküler ağırlıkta peptid ve proteinlerden oluştuğu ve biyolojik olarak aktif moleküllerden melittin, apamin, noradrenalin, serotonin, histamin ve fosfolipaz B'nin varlığı gösterilmiştir. Melittinin, fosfolipaz A2 ile birlikte eritrositlerin hemolizini gerçekleştirdiği, eritrosit hemolizi esnasında serbest kalan K⁺ (potasyum) yolu ile dolaylı olarak düz veya çizgili kas içeren çeşitli organlarda kasılma ve ağrıya sebep olduğu, trombositlere zarar verdiği, dokulardaki serotonin ve histamin içeren mast hücrelerini bozduğu, iskelet kaslarında uyarıcı rol oynayarak kasın depolarize olmasına neden olduğu, benzer şekilde, kalbin fonksiyonunu etkilediği, gangliyonlar ve merkezi

sinir sistemindeki sinapslarda hasar meydana getirerek felce neden olduğu bilinmektedir (Haberman, 1971; Schmidt, 1982; Katsu vd., 1990). Venom içeriğindeki diğer nörotoksik etkili peptit ve proteinlerden farklı olarak, melittin direkt olarak hücre zarı ile etkileşime girer ve hücre zarında spesifik bir reseptörü yoktur (Terwilliger vd., 1982; Gerristen, 2001). Diğer yandan, melittin, Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini engelleyerek iskelet kaslarında depolarizasyona neden olur. Fosfolipaz A2'yi aktive ederek sitotoksik etki yaratan melittinin arı venomu içindeki anti-karsinojenik aktivite mekanizmasında önemli bir yere sahip olduğuna inanılmaktadır (Son vd., 2007). Kanserli hücre ölüm mekanizmalarından kaspazların ve matriks metalloproteazların (MMP) aktivasyonunu da içeren apoptotik hücre ölümünün başlamasında melittinin rolü olabileceği daha önce de ifade edilmiştir (Holle vd., 2003; Moon vd., 2006). Apamin, 18 aminoasitten meydana gelen bilinen en küçük nörotoksik peptittir (Schmidt, 1982). Apaminin kan-beyin bariyerlerinden geçebildiği, nörotoksik etkilerinin yanı sıra fizyolojik etkilerinin de bulunduğu, bazı hücreler üzerinde hücre zarındaki Na^+ - K^+ ve Ca^{+2} kanallarını kapatarak etkili olduğu gösterilmiştir (Piek, 1972; Endstrom, 1992; Ikonen ve Riekkinen, 1999). Apamin memelilerin merkezi ve çevresel sinir sisteminde noradrenerjik ve GABA (gamaaminobütrik asit)'erjik yollar ile postsinaptik hücrelerde Ca^{+2} ile aktive olan K^+ kanallarını bloke eder (Gottlieb, 1988). Voltaj ve akım prob deneyleri haricen tatbik edildiğinde apaminin düşük dozlarının (0,1 μM) bile kültüre alınmış nöroblastoma ve rat kas hücrelerinde Ca^{+2} bağımlı yavaş K^+ kanalları iletkenliğini bloke ederek uzun süreli hiperpolarizasyon sonrasına sebep olduğunu göstermiştir (Banks, 1979). Apaminin bu yapısal ve farmakolojik özellikleri kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinde önemli rol oynamaktadır. Fosfolipaz sınıfına ait enzimler iyonların ve suyun geçişini düzenleyen hücre zarı porlarındaki fosfolipitler ile etkileşime girerek (Doury vd., 1997) hücre ölümünü hücrenin şişmesi ve parçalanması ile sonlanan onkotik litik mekanizmalarla gerçekleştirir (Knowles ve Ellar, 1987). Hymenoptera türlerine ait venom içeriğinde en sık rastlanan hyaluronidaz ise, hedef organizmanın bağ dokusundaki mukopolisakkarit polimerler olan hyaluronik asit ve kontraktin sülfatları hidrolize ederek diğer toksik bileşiklerin doku içerisine difüzyonunu kolaylaştırır (Haberman, 1971; Schmidt, 1982; Doury vd., 1997). Biyogenik aminler olarak gruplandırılan ve diğer Hymenoptera venomlarında da yaygın olarak bulunan histamin ve serotonin (5-hidroksitriptamin) (Yasuhara vd., 1987; Quistad vd., 1988; Owen ve Sloley, 1988), venom içeriğinde bulundukları gibi, sokma

sonucu venom içeriğinde bulunan diğer bileşenlerin etkisi ile memeli dokularındaki hücrelerden de salınabilmektedirler (Haberman, 1971). Güçlü bir allojen olan histamin, bu bileşiklerin en yaygın olarak bulunanıdır (Haberman, 1971; Schmidt, 1982; Yasuhara vd., 1987). Serotonin, karınca, bal arısı ve soliter arı venom içeriğinde nadiren bulunmasına karşın (Haberman, 1971; Owen ve Sloley, 1988), *Vespa* ve *Vespula* cinslerinden olan yaban arısı türlerinde yüksek miktarda tespit edilmiştir (Haberman, 1971; Schmidt, 1982). Biyogenik aminlerin damar genişletici, kılcal damar geçirgenliğini arttırıcı, sokma sonucu oluşan lokal kaşıntı, ağrı ve yanma yaratıcı etkileri bilinmektedir (Schmidt, 1982). Bu maddelerin toksik etkisi genellikle venom içeriğindeki diğer bileşenlere bağımlıdır (Quistad vd., 1988). Serotonin düz kasların hızla polarizasyonunu sağlayarak uyarı durumunda depolarize olma yeteneklerini azaltır (Weisel-Eichler ve Libersat, 2004). Nörotoksik etkili bileşen olarak bilinen venom içeriğindeki noradrenalin, katekolaminler grubunda bulunmaktadır (Blum, 1978; Schmidt, 1982). Noradrenalin bal arısı ve yaban arısı venomunun karakteristik bileşenidir (Blum, 1978) ve sokma sonucu etkisinin damar daraltıcı ve sokma bölgesi etrafında geçici soluk, beyazımsı görünüşe sebep olması şeklinde ifade edilmiştir (Schmidt, 1982). *P. turionellae* venom içeriğinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizi sonucunda içerikte standartlarla belirlenemeyen daha birçok bileşenin varlığı tespit edilmiş olup bu bileşenlerden ilk on dakika içinde pik verenlerin düşük moleküler ağırlıktaki diğer amin ve peptitler ve 25. dakikadan sonra oluşan piklerin ise yüksek moleküler ağırlıktaki enzimler olabileceği öne sürülmüştür (Uçkan vd., 2004; Uçkan vd., 2006). Venom içeriğindeki varlığı gösterilen ancak tespiti yapılamayan diğer peptit ve proteinlerin, sinir hücrelerinde monoaminlerin hücre içindeki sentezini etkileyerek, salınımını sağlayarak, salınımı veya hücre içine geri alımı bloke ederek, monoaminerjik reseptörlerde agonist veya antagonist etki göstererek veya reseptör duyarlılığını artırarak (Weisel-Eichler ve Libersat, 2004) farklı mekanizmalarla monoaminerjik sistemler üzerinde etkili olabileceği ifade edilmiştir. Bu nörotoksik peptitler; iyon taşınmasını etkileyen iyon geçiş kanalı toksinleri, transmitter madde salınımı mekanizmasını etkileyen presinaptik ve transmitter maddenin bağlandığı reseptörü engelleyen postsinaptik toksinler olarak iş görebilirler (de la Vega ve Possani, 2004). Parazitoit dişisinin konağa yumurta bırakma esnasında enjekte ettiği venomu ile konak hemositleri üzerine etki ederek konağa bıraktığı yumurtanın konak bağışıklık tepkileri tarafından eliminasyonunu engellemesi (Er vd., 2011b) araştırmacıları bu

bağışıklık baskılayıcı etkinin memeli hücreleri üzerinde etkili olup olmadığının tespitine de yöneltmiştir. Meyve sinekleri ve memeliler ile yapılan çalışmalar böceklerdeki doğal bağışıklık mekanizmaları olan Toll ve Imd yolaklarının memelilerdeki NF-KB (Nükleer Faktör Kappa B) yolağı ile homolog olduğunu ortaya koymuştur (Kimbrell ve Beutler, 2001). Bir Hymenopter ektoparazitoit tür olan *N. vitripennis* venomunun ise önemli memeli bağışıklık sistem yolaklarında baskılayıcı etkiye sahip olduğu yakın bir zamanda yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Kimbrell ve Beutler, 2001; Danneels vd., 2014). Özet olarak, venom veya bileşimindeki maddeler, kanser hücreleri üzerinde sitolitik aktiviteleriyle ya da kanser hücre yüzeylerindeki spesifik reseptör veya iyon kanalları ile etkileşime girerek doğrudan antitümöral etkinlik gösterebilir (Moreno vd., 2014; Fung vd., 2015).

Peptid yapılı venom bileşenleri kanser hücrelerine karşı vücudun doğal bağışıklık yanıtının uyarılmasını, hücre döngüsünde DNA sentezinde ve/veya nekrotik, apoptotik yolaklarda inhibe edici etkiler yaratabilir. İmmün sistem üzerinden gelişen etki özellikle kansere karşı aşılama stratejisinin hayata geçirilmesinde önem taşımaktadır. Bu bakımdan günümüzde sayılan ajanlara gerek standart tedavi protokollerinde gerekse kansere karşı profilaktik tedavi uygulamalarında klasik antineoplastiklerin yerlerini alacakları gözüyle bakılmaktadır. Bu nedenle *P. turionellae*'den elde edilen ham venomun memeli hücreleri üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla Glioblastoma multiforme (GBM) hücre hattı bu çalışmada kullanılmıştır.

Glioblastoma multiforme (GBM), merkezi sinir sistemindeki kanser tiplerinin yarısından fazlasını oluşturur. Agresif karakterde olup hastalığın seyri kötü prognoza sahiptir. Tedavi yaklaşımı ilk olarak cerrahi yaklaşımdır ve bunu takiben radyasyon terapisi ve/veya radyasyon ile kombine kemoterapi uygulamasıdır. Ancak, tedavi yaklaşımı ne olursa olsun tedaviye direnç ve rekürrens gelişmektedir (Mehta ve Brem, 2014; Nicolaidis, 2015). Bunun nedeni GBM'de var olan PTEN, P53 ve EGFR genlerindeki değişimler nedeniyle apoptoza olan dirençtir (Biddlestone-Thorpe vd., 2013). Bu nedenle klasik ilaç ve yöntemlerin yetersiz kalması ve sağlıklı hücreler üzerindeki yıkıcı özellikleri ve bununla ilişkili yan etkiler, araştırmacıların özellikle glioblastoma kanseri ile mücadelede alternatif arayışlara yönelmesini mecbur kılmıştır (Vesely vd., 2007). Hücre ölüm yolaklarından apoptozu uyarabilen ancak sağlıklı

hücreleri etkilemeden kanser hücrelerinin büyümelerini durdurabilen yeni yaklaşımlar araştırılmalıdır (Zargan vd., 2011). Dünyada ülkemiz de dâhil olmak üzere yaklaşık yarım yüzyıldır antitümör etkinliğe sahip biyolojik ajanlar üzerinde çalışılmaktadır. Antitümör etkinliğe sahip bu ajanlar arasında yılan, akrep ve örümcek venomlarının çok çeşitli biyolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Farmakolojik olarak aktif olan bu biyomoleküller anjiyogenez, protein sentezi, apoptoz mekanizmaları üzerinde etkilere sahiptir. Örneğin, kanser tedavisinde sahip olduğu etkiler nedeniyle akrep venomu için Faz I ve Faz II klinik denemelerine geçilmiştir (Heinen ve Gorini da Veiga, 2011). Akrep venomları üzerinde yapılan çalışmalarda özellikle sahip olduğu düşük moleküler ağırlıklı peptidler sayesinde iyon kanalları (Na^+ , K^+ ve Cl^-) üzerinde, dolayısıyla hücre aktivitesi üzerinde etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Zargan vd., 2011). Ancak endoparazitoit yaban arısı venomlarının antiproliferatif etkisine yönelik bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Çeşitli türlere ait venomlarda yapılan çalışmalarda protein bileşenlerinin anti-karsinojenik aktivite, onkotik-litik mekanizmalarla hücre ölümü, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri gibi biyolojik işlevleri gösterilmiştir (Endstrom, 1992; Ikonen ve Riekkinen, 1999; Gerristen, 2001; Son vd., 2007; Danneels vd., 2014; Sisakht vd., 2017). Arı ve yaban arısı gibi Hymenoptera türlerinden elde edilen venomların, bileşimlerinde antimikrobiyal etki, sitolitik peptitler ve enzimlerin karmaşık bir karışımı, nörotoksinler ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklere sahip oldukları da bilinmektedir (Uçkan vd., 2004; Moreau ve Asgari, 2015; dos Santos-Pinto vd., 2018). Bazı araştırmacılar, yaban arısı venomlarının, sitostatik (Liu vd., 2002), antikonvülsan (Cunha vd., 2005), antimikrobiyal (Čeřovský vd., 2008), antikoagülan (Han vd., 2008) sitotoksik, genotoksik ve mutajenik (Hoshina vd., 2013) özellikler gösterdiğini, bu nedenle yaban arısı venomlarından farmakolojik olarak yararlanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Dahası, Sisakht vd., (2017), arı venomunun insan glioblastoma hücreleri üzerinde apoptotik ve sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Daha önce yapılan bu çalışmalar göz önünde tutularak *P. turionellae* venomunun glioblastoma hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Böceklerin immün sistem yanıtları ve çalışma mekanizmaları memelilerin immün sistemleriyle büyük oranda benzerlik göstermektedir (Kavanagh ve Reeves, 2007). Jones, (1964) böcek hemositlerinin embriyonik orjinlerinin, morfolojik

özelliklerinin, ameboid hareketleri ve fagositik aktivitelerinin memelilerin akyuvarları ile benzerlik gösterdiğini belirtmiştir. Bu nedenle günümüzde bazı böcek türleri patojenik, genotoksik ve biyokimyasal çalışmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır (Cook ve McArthur, 2013; Emre vd., 2013). Çalışmada konak olarak kullanılacak olan büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* türü ise yukarıda bahsedilen testler için oldukça iyi bir fizyolojik model oluşturmakta ve laboratuvar şartlarında kolayca kültürü yapılabilir. Bu nedenle, *G. mellonella* türü hem mücadelede zararlı tür olarak hem de venomun konak üzerindeki oksidatif ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla model organizma olarak tercih edilmiştir.

Parazitoit venomları ve içeriğindeki peptid/proteinlerin hedef doku ve hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini, hücrenin kontrolsüz çoğalmasını önlemek (antiproliferatif etki), programlanmış hücre yaşam süresini düzenlemek (apoptotik etki) ve bağışıklık azalmasını engellemek (immün etki) yoluyla gösterdikleri bilinmektedir (Ergin vd., 2006; Uçkan vd., 2010). Çok hücreli hayvanlarda tüm bu mekanizma ve yolların evrimsel olarak korunması ise, bir diğer amacımız olan hipotezi ortaya çıkarmıştır. Böylece konak böcek üzerinde nörotoksik etkiye sahip olan venomun hedef olmayan organizmalarda da benzer potansiyele sahip olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla, tez kapsamında endoparazitoit *P. turionellae* venomunun memeli hücrelerindeki potansiyel toksik etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Literatürde akrep, yılan ve örümcek venomları ile ilgili (Kelle, 2007; Son vd., 2007) birçok çalışma mevcut olmasına rağmen endoparazitoit venomu ve içeriğinin memeli hücreleri üzerine etkileri konusundaki araştırmalar henüz kısıtlıdır (Hoshina vd., 2013). Venomun memeli hücreleri üzerindeki etkilerinin aydınlatılması ise gelecekte venom içeriğindeki bileşenlere ait biyokimyasal ve farmakolojik bilgilerin eldesi, venomun etki mekanizmalarının bilinmesi ile özel panzehirlerin üretilmesi ve geliştirilmesi açısından da son derece önemlidir. Çünkü yeni biyotoksinlerin etkilerinin belirlenmesi bilimsel araştırmalar kadar medikal ve ticari uygulamalar tarafından da ilgi görmektedir. Bu nedenle, konak böcekte paralitik etkiye sahip *P. turionellae* venomunun glioblastoma hücreleri üzerindeki sitoksisitesi belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, venomun hücre canlılığı üzerindeki etkilerini gösteren ve bir sitotoksisite analizi olan tetrazolyum tuzu testi (MTT) ile yine metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testi olan “Alamar Blue Assay” uygulanacaktır. Böylece, hem *P. turionellae*

venomunun ilk defa bir memeli hücresi üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkisinin olup olmadığının tespit edilmesi hem de venomun etki mekanizmalarını belirlemeye yönelik ileride yapılacak çalışmalar için uygun dozlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

1.1. Böceklerde Antioksidan Savunma Sistemi

Organizmalar, yaşamsal ihtiyaçlarını karşılamak için devamlı olarak anabolizma ve katabolizma reaksiyonları gerçekleştirirler. Bu metabolik reaksiyonlar gerçekleştirilirken gerekli olan kimyasal enerji oksidatif reaksiyonlar ile gerçekleştirilir. Aerobik organizmalar solunum ile alınan oksijenin büyük bir kısmını son elektron alıcısı olarak kullanarak ATP üretimi gerçekleştirir. Oksijenazlar tarafından geriye kalan az miktarda oksijen molekülleri ise protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar veren serbest oksijen radikallerine (SOR) dönüştürülürler (Tülüce, 2005; Karabulut, 2016).

Eşleşmemiş elektronu bulunan dolayısıyla kararsız, kısa ömürlü oldukça reaktif özelliklere sahip inorganik veya organik moleküller serbest oksijen radikalleri olarak isimlendirilmektedir (Nordberg ve Arner, 2001; Yıldızdaş, 2003; Tülüce, 2005; Kara, 2009). Bir serbest radikal atomik ya da moleküler yapıda olabilir. SOR'ler çiftleşmemiş elektronlarının olması nedeniyle başka bir moleküle elektron verebilir ya da o molekülden elektron alabilmektedirler. Bu elektron alışverişi yeni serbest radikallerin oluşmasına neden olmakta ve bu tepkimeler zincirleme olarak devam ederek karşımıza çıkmaktadır (Kara, 2009).

Oksijene fazladan elektron eklenmesine bağlı olarak gerçekleşen serbest oksijen radikallerinin oluşumu, ekzojen ve endojen kaynaklı etmenler sonucunda gerçekleşebilmektedir. Metabolik olaylar sonucunda oksijene fazladan elektron eklenmesine bağlı olarak süperoksit, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerinin ortaya çıkması ile gerçekleşiyorsa endojen etmen kaynaklı SOR oluşumu olarak belirlenmektedir. Zararlı organizmalar ile mücadele için kullanılan insektisit herbisit, kimyasal karsinogen ve diğer organik ve inorganik çevresel kirleticilerin yüksek dozlarda, bilinçsiz ve denetimsiz bir şekilde kullanılmaları sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri ise ekzojen kaynaklıdır (Isman, 2006; Senthil-Nathan, 2013).

SOR molekülleri proteinler, lipitler ve diğer çeşitli moleküller ile etkileşime girmeleri ve hücre bütünlüğünü bozmalarıyla bilinirler. Hidroksil ve peroksit yapıdaki

radikaller hücre membranı yapısında bulunan moleküllerle etkileşime girerek membranın stabilitesini ortadan kaldırıp hücrelerin hızla bozulmasına neden olmaktadır (Cutler vd., 2005; Eren, 2008; Tekcan, 2009). Bununla birlikte hücrede yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda malondialdehit (MDA) oluşumu gözlenmektedir (Heinle ve Betz, 1994; Tülüce, 2005; Halliwell ve Gutteridge, 2007). Lipid peroksidasyonu son ürününü olan MDA miktarında oluşan artış membranın stabilitesini, membran akışkanlığını ve yapısal bütünlüğünü bozmaktadır. Bu durum da hücre membranındaki iyon alışverişini etkileyerek bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olmaktadır, bunun sonucunda da hücrede enzim aktivitesinin ve iyon geçirgenliğinin değişimi gibi olumsuzluklar gözlenmektedir. Ayrıca, MDA genetik materyalin nitrojen bazları ile etkileşime girerek hücrede genotoksik ve karsinogenik olaylar dizisine neden olmaktadır (Tülüce, 2005).

DNA replikasyonu sırasında gerçekleşen bu takım etkileşimler mutasyonlara ve genetik bozukluklara sebep olmaktadır. SOR moleküllerinin çekirdek membranını etkilemesiyle DNA'nın mutasyonlara açık hale gelmesine ve dolayısıyla kırıkların oluşmasına neden olmaktadır. Hidroksil radikali bulunduran SOR molekülleri bazlar ve deoksiribozla etkileşime girerler, bu nedenle, SOR ile indüklenen hücresel modifikasyonların DNA hasarlarının en önemli nedeni olduğu düşünülmektedir (Ardağ, 2008; Tekcan, 2009).

Membran yapısında meydana gelen bu değişimlerin neden olduğu başka bir durum ise iyon değişiminin, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun, enzimlerin, hormonların ve nörotransmitter maddelerin olumsuz yönde etkilenmesidir (Yıldızdaş, 2003; Eren, 2008; Kara, 2009). Proteinlerde meydana gelen değişimlerde ise fragmentasyon, çapraz bağlanma, protein agregasyonu olarak araştırmacıların karşısına çıkmaktadır. Bunun sonucunda da konformasyon ve fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Yıldızdaş, 2003). Bunların yanında hücresel hasar boyutlarındaki değişimlere proteinlerin aminoasit dizilimleri, hücresel konumları ve serbest radikalın toksisite gücü etkili olmaktadır (Tülüce, 2005). Bunlara ek olarak monosakkaritlerin otooksidasyonuna neden olan SOR molekülleri okzoaldehitler, hidrojen peroksit ve peroksitlerin oluşmasına sebebiyet vermektedir (Tülüce, 2005).

Hücrede artan SOR'a bağlı meydana gelen zararlar şu şekilde özetlenebilir;

- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırır,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Trombosit agregasyonunu arttırır,
- Hücre organelleri ve membranındaki lipit ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, ksantinoksidaz, indolamin, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,
- Hücrenin potasyum kaybını arttırır,
- Hücre dışındaki kollagen doku bileşenlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (Özkaya, 2007),
- Bağışıklık sistemindeki hücreleri tahrip ederek bağışıklık sisteminin etkisini azaltır (Ardağ, 2008).

SOR moleküllerinin neden olduğu bu değişimler hücre tarafından fizyolojik onarım mekanizmaları ile onarılmaya çalışılmaktadır. Bu mekanizmaların başında ise antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır ve hücresel homeostazinin korunmasına yardımcı olmaktadır (Tülüce, 2005). SOR molekülleri ile antioksidan savunma sistemi arasında bulunan homeostazi sağlanamaz, SOR moleküllerinin neden olduğu hasar önleyemeyecek düzeye ulaşırsa organizmanın oksidatif strese girmesine neden olmakta ve bu sürecin sonunda hücre ölümleri karşımıza çıkmaktadır (Greathouse vd., 2005). SOR moleküllerine karşı görevli olan antioksidan sistem elemanları, genellikle yapılarında fenolik fonksiyonel gruplar bulundurlar ve farklı oksidasyon reaksiyonların düzenlenmesi sorumluluğunu üstlenmektedirler (Cutler vd., 2005; Ardağ, 2008). SOR moleküllerine kendi elektronlarını aktaran antioksidan sistem elemanları reaktif forma dönüştürmeden kalabilmektedir ve böylece hücrenin korunmasında görev almaktadırlar (Özkaya, 2007).

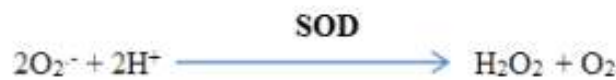
Antioksidan sistem elemanları enzimatik olan ve olmayan bileşenlerden meydana gelmektedir. Enzimatik olmayan sistemde α -Tokoferol (Vitamin E), β -karoten

(Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C), folik asit (Vitamin B9) selenyum, seruloplazmin, transferin, koenzim Q-10 bileşikleri tarafından oksidatif stres ile mücadele edilmektedir. Enzimatik sistemde ise süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksizdaz, glutatyon-S-transferaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimler yer almaktadır (Meister ve Anderson, 1983; Diplock, 1998; Ou vd., 2002).

Antioksidan savunma sistemleri faz I (primer) ve faz II (sekonder) süreçlerini kullanarak SOR moleküllerini detoksifikasyona uğratırlar. Primer savunmada hidroliz, oksidasyon ve indirgenme reaksiyonları meydana gelmektedir. Genellikle toksisitesi olan maddenin biyolojik aktivitesinin azaltılmasında faz I reaksiyonları kullanılır. Çünkü faz I metabolitleri toksik maddeyi vücuttan uzaklaştırılmak için gerekli polar yapıya sahiptirler.

Faz II reaksiyonlarında ise, şeker, sülfat, fosfat, amino asit ya da glutatyon gibi çeşitli endojen maddeler polar ürünlere eklenerek aktif moleküllerin kontrolü gerçekleştirilir (Timbrell, 1991; Grant, 1991).

Aerobik özellik gösteren tüm hücrelerde, bulunan SOD enzimi, süperoksit radikallerini etkisiz hale getirerek, hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korumaktadır. İçeriğindeki metal iyonuna göre mitokondriyal tetramerik Mn-SOD ve sitozolik dimerik Cu/Zn-SOD olarak adlandırılabilen SOD enzimi, süperoksit anyonunun (O_2^-), hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne dönüşümünü sağlayan enzimdir (Görsel 1.3) (Fang vd., 2002). H_2O_2 molekülü, biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmemesine rağmen daha reaktif oksidanların oluşumunda öncül madde olarak rol oynamaktadır. Bu molekülün su ve oksijene dönüştürülmesi katalaz enzimi etkisiyle gerçekleşmektedir (Görsel 1.4) (Duthie vd., 1989). Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan katalaz, bir metalloproteinaz enzimi olarak redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalizörleri arasında gösterilmektedir (Larson, 1988). Bununla birlikte etil hidroperoksit ve metil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin de indirgenmesini sağlamaktadır.

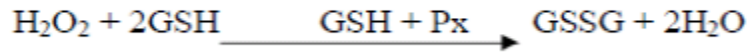


Görsel 1. 3. Süperoksit dismutaz enzim reaksiyonu



Görsel 1. 4. Katalaz enzim reaksiyonu

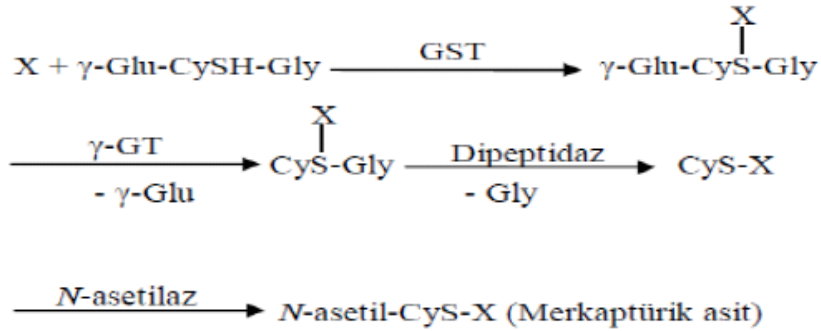
Tiyol grupları içeren enzimatik antioksidanlar SOR yakalanmasında görevli olan enzimler arasında yer almaktadır. SOR moleküllerinin etkisini azaltan veya önleyen transferazlar ve peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak rol oynayan glutatyon, suda çözünebilme yeteneğine sahip, hücrede yüksek konsantrasyonlarda bulunabilen ve tiyol yapısına sahip bir molekül olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra glutatyon, enzimatik reaksiyonlar ile hücre membranlarını lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır (Di Mascio vd., 1991). GSH-Px, redükte glutatyonu (GSH) yükseltgeyerek oksitlenmiş hale (GSSG) getirirken H_2O_2 'i de suya çeviren tetramerik yapıda selenyum atomu bulunduran sitozolik bir enzimdir (Görsel 1.5).



Görsel 1. 5. Glutatyon peroksidaz enzim reaksiyonu

GST ise GSH ile birleşerek ekzojen ve endojen kaynaklı olabilen, hidrofobik ve elektrofilik toksik maddelerin daha az toksik olan ve suda çözünebilir ürünlere dönüştürülmesini sağlayan Faz-II detoksifikasyon enzim ailesinin bir üyesidir. GST enzimi, homodimerik ya da heterodimerik yapıda bulunan birçok gen bölgesi tarafından ifade edilebilme yeteneğine sahip bir enzimdir (Dagget vd., 1998; Casalino vd., 2004; Baş, 2006). GST enzimi detoksifikasyon yapabilmenin yanında hücre içinde taşıyıcı ve bağlayıcı roller üstlenir, ksenobiyotikleri redükte glutatyondaki sisteine ait $-\text{SH}$ grubuna bağlayarak, onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler. Böylece bu ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlar. Oluşan bu GSH konjugatları organizmadan atılır ya da merkaptürik asit gibi daha ileri metabolitik yollar için substrat olarak kullanılmaktadır (Görsel 1.6) (Habig vd., 1974; Baş, 2006; Tülüce, 2005). Ayrıca besinlerle alınan toksik maddelerin, metabolik işlemlerini gerçekleştirirken, besinlerin besinsel değerlerini kaybettirmeksizin eliminasyonuna da katkıda bulunurlar (Baş,

2006).



Görsel 1. 6. *Merkaptürik asitin oluşum süreci. X, GSH ile konjugasyon yapan ksenobiyotiği göstermektedir*

Diğer canlılara benzer şekilde böcekler de ekzojen ve endojen kaynaklı oksidatif stres ajanlarının etkilerini azaltmak veya ortadan kaldırmak için antioksidan savunma sistemi elemanları bulunmaktadır (Ahmad, 1992; Felton ve Summers, 1995; Barbehenn vd., 2001; Nordberg ve Arner, 2001; Krishnan ve Sehna, 2006; Fahmy, 2012). Bu savunma sistemi de enzimatik olan ve olmayan sistem olarak ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik savunma sisteminde başlıca yer alan SOD, KAT, GPx, GST gibi enzimlerin yanısıra (Krishnan ve Kodrik, 2006, Ahmad vd., 2005), yalnızca böceklerde bulunan bazı enzimlerde bulunmaktadır. Bunlar, askorbat peroksidaz ve tiyoredoksin peroksidaz enzimleridir (Mathews vd., 1997; Missirlis vd., 2003). Bununla birlikte, hücre zarında ve diğer hücresel lipid yapılarında, SOR moleküllerinin neden olduğu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomunun çıkarılmasıyla başlayan lipid peroksidasyonu sonucu malondialdehit gibi aldehit türevlerinin oluşumunda görülmektedir. Bu nedenle, lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak MDA miktarındaki değişimler de incelenmektedir (Ahmad vd., 1995; Mano vd., 1995; Krishnan vd., 2009).

Konak böceklerde hemositlerin parazitoit venomuna karşı gösterdiği immün cevaplar da göz önüne alınarak, bu çalışmada endoparazitoit *P. turionella* venomunun konak hemolenfinde bulunan antioksidan sistemi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. *G. mellonella*'nın pupal antioksidan sistemi üzerindeki etkileri, SOD, KAT ve GST aktivitesindeki değişimler ile belirlenirken, hücre lipid yapılarında meydana gelen değişiklikler ise malondialdehit miktarındaki değişimler ile analiz edilecektir.

1.2. Genotoksisite

Canlı sistemler çeşitli fiziksel, kimyasal ya da çevresel stres ajanlarına maruz kaldıklarında genetik yapılarında önemli değişiklikler gözlenmektedir. Bu stresörlerin genetik materyal üzerinde oluşturdukları toksikolojik etkiler genotoksik etki (ya da genotoksisite) olarak adlandırılmaktadır (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010). Genotoksik ajan, DNA’da yapısal değişiklikler oluşturarak ya da DNA kırıklarına yol açarak hücresel disfonksiyonlara neden olan çeşitli kimyasal ve fiziksel her türlü ajan için kullanılabilen bir terimdir (Ündeğer ve Başaran, 2005). Genotoksik ajanların neden olduğu fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin genetik yapıyla da ilişkili olduğu laboratuvar ortamında da gözlemlenebilmektedir (Gichner vd., 2009; Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010). Bu sebeple, bu ajanların DNA’da meydana getirdikleri hasarın belirlenmesiyle ilgili çalışmaların her geçen gün önemi artmaktadır. (Çavaş ve Könen, 2007; Yılayaz, 2008; Muranlı-Gökalp ve Güner, 2011; Eskandari vd., 2012; Pavela, 2013; Packiam vd., 2015).

1970’lerden başlayarak günümüze kadar genotoksik ve mutajenik maddelerin karsinogenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilip kullanılmıştır (Bedir vd., 2004). *In vivo* ve *in vitro* olarak gerçekleştirilmiş olan bu testler, çeşitli mekanizmalarla dolaylı ya da doğrudan genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamaktadır (Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005). DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili çok sayıda teknik kullanılmasına rağmen bunların birçoğunun zaman, maliyet, radyoaktif madde kullanımı bu alanda yapılan çalışmalar için dezavantaj oluşturmaktadır (Tice vd., 2000; Gichner vd., 2009). Son 10 yıl içinde geliştirilen, DNA’da hasar olup olmadığını, varsa hasar seviyelerinin anlaşılmasını sağlayan “tek hücre jel elektroforezi” veya “COMET Analizi” tıp ve biyoloji alanlarında yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Koçyiğit vd., 2005; Lin vd., 2007; Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010; Şekeroğlu-Atlı ve Şekeroğlu, 2011).

COMET analizi, fiziksel ve kimyasal mutajenlerin, bazı kalıtsal hastlıkların ve kanserin neden olduğu DNA’daki tek ve çift zincir kırıklarının tespitinde kullanılmaktadır. COMET analizinde kullanılması gereken hücrelerin mitotik olarak aktif olmaları bu analizde diğer yöntemlerden farklı olarak gerekmediğinden daha hassas, güvenilir ve hızlı kısaca daha avantajlı bir yöntemdir (Şekeroğlu-Atlı ve Şekeroğlu, 2011; Hayashi vd., 1998). Bu yöntemde ökaryotik canlıdan izole edilen

hücreler, düşük kaynama dereceli agaroz çözeltileri ile fikse edilerek elektroforetik ortamda yürütülür. DNA moleküllerinin tek veya çift zincirlerinde meydana gelen kırılmalar farklı molekül ağırlıkları olduğundan farklı hızlarda göç ederler. DNA boyanmasından sonra incelenen hücrelerde, hasarlı olanlarda kuyruklu yıldız benzer DNA kırıkları görülmektedir (Singh vd., 1988).

COMET yöntemi ile hücrede kimyasallara bağlı olarak ortaya çıkan DNA hasar miktarlarının belirlenmesi genellikle memeli veya insan hücrelerinde gerçekleştirilmektedir (Collins vd., 1995; Duthie ve Collins, 1997; Van-Goethem vd., 1997; Cotelle ve Ferard, 1999; McNamee vd., 2000). Bu çalışmaların yanı sıra bazı omurgasız hayvanların hemositlerinde de COMET yöntemi ile genotoksik hasar tespiti yapılmıştır (Siu vd., 2004a; Woźnicki vd., 2004; Türkez vd., 2010; Martínez-Paz vd., 2013; Kurt ve Kayış, 2015). *Drosophila melanogaster* ile yapılan bir çalışmada insektisit olan cypermethrine maruz kalan larvaların beyin gangliyonlarında ve ön bağırsaklarında DNA hasarı doz artışına bağlı olarak önemli derecede arttığı COMET analizi ile gösterilmiştir (Mukhopadhyay vd., 2004). Benzer bir çalışmada mutajenik ve genotoksik özellikleri bilinen, etil metanosülfanat, metil metanosülfonat, N-etil N-nitroseta ve siklofosfamid gibi ajanların da *D. melanogaster*'de aynı yöntemle DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Siddique vd., 2005). Bir başka çalışmada ise *Chorthippus (Glyptobothrus) brunneus* larvalarından elde edilen hücrelerin hidrojen peroksit ile muamele edilmesi sonrası DNA hasarına neden olduğu aynı analiz ile değerlendirilmiştir (Augustyniak vd., 2014).

Sitogenetik hasarların tespitinde kullanılan yöntemlerden bir diğeri ise mikronukleus (MN) analizidir. Mikronukleuslar, bazı kromozomlar ya da kromozomal fragmentlerin mitoz bölünmenin anafaz evresi sırasında nukleus dışında kalmasıyla ortaya çıkmaktadır (Siu vd., 2004a). Yapılan son çalışmalarda bir kimyasal ajana maruz kalan canlıların ekotoksikolojik risk değerlerini saptamak için COMET ile MN analizlerinin birlikte değerlendirildiği görülmektedir (Zang vd., 2000; Woźnicki vd., 2004; Çavaş ve Könen, 2007; Eskandari vd., 2012). Ayrıca böcek hemositlerinde kimyasallara bağlı olarak yapısal anormalliklerin görüldüğü de bilinmektedir (Yeh vd., 2005). Bu nedenle hemositlerde gözlenen değişimler, özellikle genotoksik etkilerin ortaya koyulması çevresel risk değerlendirme çalışmalarında, biomarker olarak değerlendirilebilirler. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda pestisitlerin böcekler

üzerindeki genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için, mikronukleus analizi kullanılmıştır (Siu vd., 2004b; Bolognesi vd., 2011). Bu çalışmalar sınırlı sayıda karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmalar genellikle Mollusca filumunda bulunan canlılarda yapılmış ve çevresel kirliliğin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır (Burgeot vd., 1995; Venier vd., 1997; Pinto-Silva vd., 2003). Uçkan ve Sak (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise konak *G. mellonella*'nın larval besinine farklı dozlarda cypermethrin uygulanmıştır. Bu insektiside larva döneminde maruz kalan konak pupları endoparazitoit *P. turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişi bireylerine sunularak, parazitoitin konak yoluyla insektiside maruz kalması sağlanmıştır ve parazitoit larval hemositlerinde MN analizi yapılmıştır. Çalışmada cypermethrinin yoğunluğunun artışına bağlı olarak MN sayısının parazitoit hemositlerinde arttığı gözlenmiştir (Uçkan ve Sak, 2010). Bu bilgiler ışığında, çalışma kapsamında pupal hemositlerde mikronukleus (MN) sayımı yapılarak, *P. turionellae* venomunun konaktaki sitogenetik etkileri belirlenecektir. Ekotoksikolojik analizlerde MN oluşumunun ve DNA hasarının birlikte analizlenmesi genotoksik materyalin uygulandığı canlıda zamana ve doza bağlı değişimlerin karşılaştırılmasında olanak sağlamaktadır. Ayrıca Heddle vd., (1983)'ne göre DNA kırılmaları, MN oluşumuna neden olan kromozomal fragmantasyondan önce ortaya çıkabilir.

Bu çalışmada ise endoparazitoit *P. turionella* venomunun konak hemositleri üzerindeki genotoksik etkileri COMET ve MN analizleri ile ilk kez belirlenmesi hedeflenmiştir.

1.3. Konak ve Endoparazitoitin Sistematikteki Yeri

1.3.1. *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Büyük Balmumu Güvesi)

Bu çalışmada konak tür olarak kullanılan büyük balmumu güvesi *G. mellonella* larval dönemde arı kovanlarında onarılamaz hasarlar veren zararlı bir kelebek türüdür. Arı bulunan her yerde yaşayabilme yeteneğine sahiptir. *G. mellonella* dişileri yumurta bırakmak için hava karardıktan sonra arı kovanlarına girerler. Kovan içerisinde yumurtadan çıkan larvalar peteğin orta taban kısmında tünel açarak ve ağ örerek zayıf kovanların çökmesine dolayısıyla arı kolonisinin dağılmasına neden olurlar bu nedenle arıcılığa büyük oranda zarar verirler (Öder, 1983). *G. mellonella* türüne ait bireyleri arı kovanlarına verdiği zarar özellikle Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgeleri gibi rakımı düşük ve nemi yüksek olan yerlerde karşılaşılan bir durumdur (Kwadha vd., 2017).

Bu türe ait bireyler sahip olduğu anatomik ve fizyolojik özellikler, yüksek çoğalma yetenekleri ve laboratuvar koşullarında kolayca kültüre alınabilmeleri nedeni ile birçok çalışmada model organizma olarak değerlendirilmektedirler. Larval dönemleri böceklerin hem humoral hem de hücrel savunma mekanizmalarına uygun model oluşturmaktadır. Erginleri çalılık arazide yayılım gösterirler. Erginlerin boyutları yaklaşık olarak kanatlar kapalı pozisyonda 12-18 mm iken, kanatlar açık pozisyondayken 20-25 mm uzunluğundadırlar. Ön kanatları çoğunlukla grimsi renkte ve kırmızımsı kahverengi tonlarda desenlere sahiptir. Genellikle ergin dişiler akşamüstü saatlerinde kovanlara girerek bal arılarının ulaşamayacakları yarık ve deliklere yumurtalarını bırakırlar. Yumurtalarının boyu eninden biraz uzun, 0,5 mm'den biraz küçük olup, pembemsi krem veya beyazımtırak renktedirler. Bu yumurtalar normal koşullarda (24–26 °C) yaklaşık 5-10 günde açılır ve içlerinden 1. evre larvalar çıkar. *G. mellonella* larvaları yumurtadan yeni çıktıklarında sarımtırak beyaz renkte olurlar ve oldukça hareketlidirler. Gelişmesini tamamlayan larvalar beyazımtırak kül renginde ve dorsal yüzeyi daha çok sarımtırak siyah renktedir. Larvalar balmumu, polen, bal arısı larval gömlekleri ve bal arısı atıkları ile beslenmektedirler. Beslendikleri besinin kalitesine ve miktarına göre boyutları 21,7-31,7 mm arasında değişmektedir. Larvalarda 3 çift ön üye ve 4 çift yalancı abdominal üye vardır. Sıcaklık ve besin varlığına bağlı olarak larval gelişim 1-5 ay arasında gerçekleşmekte ve larvalar pup oluncaya kadar yedi kez gömlek değişmektedirler. Larval gelişimin arkasından pupal dönemleri başlar. Öncelikle sarımsı veya açık kestane renginde olan puplar, pupal dönemin sonuna yaklaştıkça gittikçe koyulaşırlar. Pupların dorsal yüzeyinde bariz bir orta çizgi bulunmaktadır. Bu çizgi ergin çıkışında yırtılır. Pupun ventral yüzeyinde kanat, anten, hortum ve çiftleşme organları ayırt edilebilir. Ayrıca V. ve VI. segmentler üzerinde yalancı abdomen üyeleri görülür. Pupal dönem sıcaklık ve neme bağlı olarak 6-14 gün devam etmektedir. Pupun açılmasıyla yeni çıkış yapan erginlerin kanatları henüz tam kurumamıştır ve bulunduğu ortamın ısisına bağlı olarak iki saat içinde kurur (Görsel 1.7). Erginler gündüz olduğunda arı kovanının karanlık köşelerinde gizlenirken, geceleri aktiftirler. Pupadan çıkış yapan ergin dişi ve erkekler 24 saat içinde çiftleşirler. Dişiler çiftleştikten 1-10 gün sonra yumurtlamaya başlarlar. Bir dişi tek seferde paketler halinde 100 yumurta bırakabilir ve hayatı süresince ürettikleri yumurta sayısı 300-600 arasında değişir. Ergin dönemde beslenme yeteneğine sahip olmayan bireyler yaklaşık

olarak 3- 30 gün yaşarlar ve çiftleşen dişiler yumurtalarını bıraktıktan sonraki 7 gün içinde ölürlür (Özer, 1961).

Sistematikteki yeri

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Lepidoptera

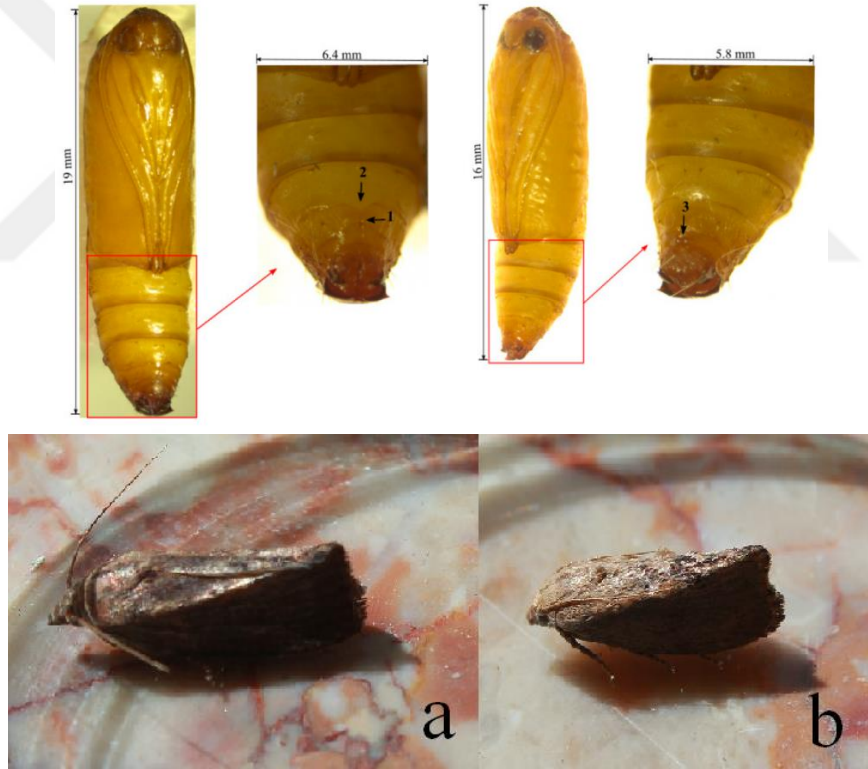
Üstfamilya: Pyraloidea

Familya: Pyralidae

Altfamilya: Galleriinae

Cins: *Galleria* (Fabricius, 1798)

Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)



Görsel 1. 7. Konak *G. mellonella* pupa (Kwadha vd., 2017) ve ergin bireyi. a: dişi, b: erkek

1.3.2. *Pimpla turionellae* Linnaeus, 1758

Çalışmada parazitoit tür olarak kullanılan *P. turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) birçok lepidopter türünün prepup ve pupunda soliter, idiobiont ve endoparazitoit olarak gelişen bir türdür (Kansu ve Uğur, 1984; Uçkan ve Gülel, 1990). *P. turionellae* çok geniş bir konak aralığına sahiptir. Konakları arasında *Lymantria*

dispar (Lep: Lymantridae), *Pieris rapae* (Lep: Pieridae), *Agrotis segetum* (Lep: Noctuidae), *Euproctis chrysorrhoea* (Lep: Lymantridae), *Malacosoma neustria* (Lep: Lasiocampidae), *Cydia pomonella* (Lep: Olethreutidae), *Yponomeuta malinellus* (Lep: Yponomeutidae), *Ephestia kuehniella* (Lep: Pyralidae), *E. cautella* (Lep: Pyralidae) ve *G. mellonella* (Lep: Pyralidae) türleri bulunmaktadır (Kansu ve Uğur, 1984). Bu konak türlerin çoğunluğu çeşitli bitkiler üzerinde özellikle de meyve ağaçlarında larval gelişimleri süresince beslenen zararlı kelebek türleridir. *P. turionellae* yüksek derecede bir pup parazitoiti olup, çok sayıdaki Lepidoptera takımına ait türlerin pupal dönemini parazitlemektedir (Kansu ve Uğur, 1984; Uçkan ve Gülel, 1990). Parazitoitin yumurtalarından çıkan larvalar konakları olan pupların dokularından ve vücut sıvılarından beslenerek larval gelişimlerini devam ettirirler. Kış dönemini olgun larvalar olarak pupların içinde geçirirler. Ergin dişilerin yumurta bırakacak döneme ulaşmaları yaklaşık 3-6 gün sürerken, dişiler yaklaşık 50 gün süreyle konak puplarına yumurtalarını koyabilirler. Ergin dişiler çoğunlukla konak büyüklüğüne göre yumurtalarını bırakırlar ve konaktan çıkan erginin cinsiyeti de konak büyüklüğü ile ilişkilidir. Yumurta ve ergin dönem arasındaki gelişim süresi de konağa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. *G. mellonella*'nın puplarında gelişme süresi dişiler için ortalama 17-19 gün iken, erkeklerde 16-18 gün arasında olmaktadır. *P. turionellae* erginleri hem meyve özleri, bal ve nektarla beslenirler hem de dişiler konaklarına yumurta bıraktıktan sonra ovipozitörle deldikleri bölgeden dışarı sızmakta olan hemolenften beslenirler. Erginlerin büyüklükleri 4,5-12 mm arasında ve kanatların uzunlukları da 3-11,6 mm arasında değişmektedir. Dişilerde yumurta bırakmaya yarayan bir ovipozitör bulunmaktadır. Larval dönemde konak vücudunda gelişme gösterdikleri için hareket etmeye yarayan üyeleri bulunmamaktadır ve kutikulası çok ince olup kolaylıkla gaz değişimini vücut yüzeyinden gerçekleştirmektedir. Yumurtadan çıkan larvalar yaklaşık 10 gün içinde pupal döneme ulaşırlar ve bu dönemin sonuna doğru ergine ait antenler ve gözler belirginleşir. Konaklarının ölümüyle sonuçlanan bu ilişkide konaklarını ergin olarak terk ederler (Görsel 1.8) (Kılınçer 1975; Osman 1978; Yazgan 1981; Kansu ve Uğur, 1984; Uçkan ve Gülel, 1990).

Sistematikteki yeri

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Hymenoptera

Üstfamilya: Ichneumonoidea

Familya: Ichneumonidae

Altfamilya: Pimplinae

Cins: *Pimpla*

Tür: *Pimpla turionellae* (Linnaeus, 1758) Sinonimi *Coccygomimus turionellae*'dır.

4 tane alt türü bulunmaktadır. Bunlar:

Pimpla turionellae basiflava (Constantineanu & Ciochia, 1967)

Pimpla turionellae moraguesi (Schmiedeknecht, 1888)

Pimpla turionellae nana (Constantineanu, Ciochia, Constantineanu, Mustata & Ularu, 1967)

Pimpla turionellae tricolor (Constantineanu, Ciochia, Constantineanu, Mustata & Ularu, 1967) olarak bilinmektedir

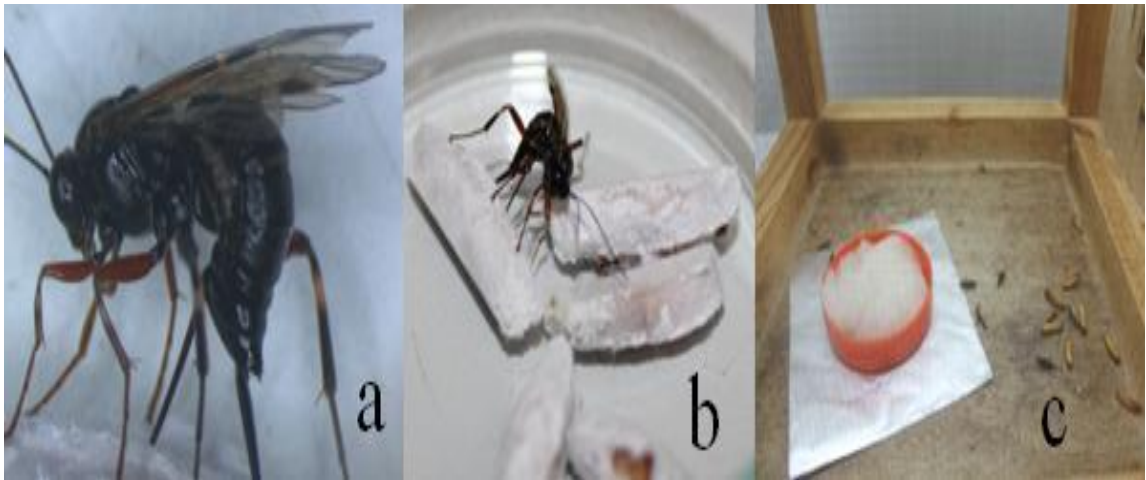


Görsel 1. 8. Parazitoit *P. turionellae*'nın larva, pupa ve ergin dönemleri (♀♂)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Parazitoit ve Konak Kültürlerinin Kurulması

Çalışmalarda kullanılan parazitoit arı türü venomu doğal konağı *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) pupası olan idiobiont, soliter endoparazitoit *P. turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)'den elde edildi. Konak ve parazitoit süksesif kültürleri Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarında konak kültür için $29 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%50 \pm 5$ bağıl nem ve 0: 24 (A: K) periyotlarda, parazitoit kültürü için ise $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%60 \pm 5$ bağıl nem ve 16: 8 (A: K) saat ışıklandırma içeren D 51-40 ve D 51-41 numaralı iklim odalarında yetiştirildi. Parazitoit türün yetiştirilmesinde $\%50$ bal çözeltisi ve konak pupundan (üç günde bir her 10 dişi parazitoit için 10 pupa) oluşan besin (Görsel 2.1), konak türün yetiştirilmesinde ise tablo 2.1'de içeriği verilen yarı sentetik (petek, bal, su, gliserin ve kepek karışımından oluşan) besin kullanıldı. Konak larvaları son larva evrelerine doğru kültürden alınıp içerisinde sadece katlanmış kâğıt bulunan kavanozlarda pupa olmaları sağlandı (Görsel 2.2). Elde edilen pupaların bir kısmı; deney uygulamalarında, bir kısmı parazitoit kültürlerinin devamında ve parazitoit türün beslenmesinde kullanılırken bir kısmı ise erginleştirilerek konak kültür üretimi için kullanıldı. Ayrıca, parazitoit türden venom eldesi için yapılan tekraralarda farklı ırkların kullanımı için konak ve parazitoit kültürleri Marmara ve Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümlerinden alınan kültürlerle desteklendi.



Görsel 2. 1. *P. turionellae* a,b: parazitleme yapan ergin birey, c: besin

Tablo 2. 1. *Galleria mellonella* yarı sentetik besiyeri

Besin Bileşimi	Miktar
Petek	100 g
Kepek	430 g
Polen	20 g
Bal	75 ml
Gliserin	150 ml
Saf Su	75 ml



Görsel 2. 2. *G. mellonella* a: ergin bireylerden oluşturulan kültür, b: larvaların yetiştirildiği kavanozlar, c,d: puplaşmanın sağlandığı kağıt bulunan kavanozlar

2.2. Venom Eldesi ve Saklanması

Deneylerde kullanılan venom 15-20 günlük *P. turionellae* dişilerinden daha önce Uçkan vd., (2004) tarafından tanımlanan metot ile elde edildi. Venom alınmadan önce dişiler -20°C’de 10 dak. bekletildikten sonra venom keseleri(Görsel 2.3) stereoskopik mikroskop altında diseksiyon iğneleri ile çıkartılarak içerisinde 20 µl böcek tamponu (ISB) [150 mM NaCl, 10 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, pH: 7,0] bulunan ependorf tüpleri içine alındı. Ependorf tüpleri +4°C’de 12,000 g de 10 dak. santrifüj edilerek hücre artığı uzaklaştırıldıktan sonra üste kalan supernatant ham venom olarak kullanıldı. Bu sıvı temiz bir mikrosantrifüj tüpüne nakledildikten sonra anında –

80 °C’de dondurularak, kullanıma kadar saklandı. Her bir venom alınımında 10’ar adet dişi kullanıldı.



Görsel 2. 3. *P. turionellae* venom kesesi

2.3. Total Protein Analizi

Venom örneklerinde bulunan toplam protein miktarının belirlenmesi Bradford yöntemi (Boya-Bağlama veya Coomassie brilliantblue) kullanılarak yapıldı. Bu yöntemde Coomassie brilliant blue G-250 boyasının, farklı dozlardaki (0,1 - 1,4 mg/ml) protein çözeltilerinde BİOTEK marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında Gen 5 programı kullanılarak protein miktarları 595 nm’de mavi renk ortaya koyması esassından yararlanılarak tespit edildi. Standart protein olarak sığır serum albümin kullanıldı (Bradford, 1976). Bu işlemler için öncelikle 10’ar adet dişiden oluşan venom örnekleri çözdürüldü. Ayrıca, çözdürülen örneklerdeki venom aktivitesinin azalmaması için bu örnekler 24 saat içinde, belirlenen analizlerde kullanıldı. Bu nedenle her bir deneysel analize başlamadan önce ihtiyaca göre gerekli miktarda venom tüpleri çözdürüldü ve toplam protein miktarı belirlendi.

2.4. Hücre Kültürü

Saflaştırılan venomun memeli hücreleri üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, C6 glioblastoma hücreleri kullanıldı. Bu çalışmalarda kullanılmak üzere yeterli miktarda stoğun temin edilmesi için C6 glioblastoma hücreleri çoğaltıldı. Hücreler inaktif hale getirilmiş %10 Fetal Bovine Serum, %1 penisilin-streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren DMEM-F12 besiyerinin bulunduğu 75 cm²’lik flasklarda %95

hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe kültüre edilerek üretildi. Deneylerin devamlılığını sağlamak amacıyla ilk olarak düşük pasaj numaralarında stoklandı. Stoklama işlemi için hücre flasklarında bulunan medyum çekilerek hücreler PBS (fosfat tampon tuzu) ve PBS-EDTA ile yıkandı ve hücrelerin flask tabanından ayrılmasını sağlamak amacıyla %0,25 Tripsin-EDTA içeren solüsyonda 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda 2 dak. bekletildi. Flask tabanından ayrılan hücrelere taze medyum eklenerek 1200 rpm'de 5 dak. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra kalan medyum çekilerek kalan pellet üzerine %10 DMSO içerecek şekilde taze medyum konuldu ve hücreler muhafaza edilmek üzere kaldırıldı. Deneylerin devamında kullanılmak üzere ayrılan flasklarda kültür devam ettirildi.

2.4.1. MTT Analizi

P. turionellae venomunun rat glioblastoma hücreleri üzerinde sitotoksik olan dozlarının belirlenmesi için tetrazolyum tuzu testi (MTT) yapıldı. Böylece, *P. turionellae* venomunun ilk defa bir memeli hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi tespit edildi. Hücreler, DMEM-F12 besi yeri, %10 Fetal Sığır serumu (FBS) içeren besi ortamının konulduğu flasklarda, 37°C 'de ve % 5 CO₂ içeren inkübatöründe kültüre edildi. Deney için yeterli sayıya ulaşan hücreler, Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 1x10⁴ hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından besi yerleri uzaklaştırılarak elde edilen venomun sitotoksikite davranışlarını anlamak üzere çalışmalar yapıldı. Ön deneme çalışmaları sonucunda elde edilen uygun venom dozları (176,6, 83,3, 22,07, 5,5 ve 1,83 µg/ml), sadece DMEM-F12 eklenmiş kontrol ve (stok venom dozunun hazırlanması için kullanılan maksimum venom miktarı kadar) ISB tamponu hücrelere uygulandı. Daha sonra hücreler farklı zaman süresince (4 ve 24 saat) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında venom içeren besi yerleri hücrelerden uzaklaştırılarak, 100 µl MTT-DMEM-F12 (1:10) ilavesi yapıldı ve test maddelerinin hücre çoğalmasına olan etkileri saptandı. Bu nedenle hücreler 5 mg/ml MTT stok solüsyonu ile 2 saat CO₂ inkübatöründe inkübe edildi ve süre sonunda MTT içeren besi yerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Ardından her kuyucuğa 100 µl DMSO ilave edilip, 5 dak. beklendikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm (750 nm referans) dalga boyunda ölçüldü. Deneyler 4 kez ve 4 tekrarlı olmak üzere gerçekleştirildi.

2.4.2. Alamar Blue Assay

Venomun sitotoksik dozlarının rat glioblastoma hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla “Alamar blue assay” yapıldı. Alamar mavisi boyasında bulunan aktif bileşen hücre zarından geçebilen ve toksik olmayan mavi renkli, floresan özellik göstermeyen resazurindir. Resazurinin hücre içine girdikten sonra kuvvetli kırmızı floresan veren resofurine indirgenmesi esasına dayanan bu yöntemde, floresan Eks./Em.: 560/590 nm’de, absorbans ise 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Hücreler, DMEM-F12 besi yeri, %10 Fetal Sığır serumu (FBS) içeren besi ortamının konulduğu flasklarda, 37°C’de ve % 5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. Deney için yeterli sayıya ulaşan hücreler, Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 1x10⁴ hücre/ml gelecek şekilde ekildi. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde, belirlenen venom dozları (176,6, 83,3, 22,07, 5,5 ve 1,83 µg/ml) ve ISB (stok venom dozunun hazırlanması için kullanılan maksimum venom miktarı kadar) eklendi. Belirlenen süreler sonunda venom içeren besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl Alamar blue-DMEM-F12 (1:10) reaktifleri eklendi. Reaktif eklendikten sonra hücreler 37 °C’de 4 saat inkübe edildi ve ölçüm alındı. Analizler 4 kez ve 4 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Hesaplama Azalan Yüzde = $[(\epsilon_{OX})_{\lambda 2} \times A_{\lambda 1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda 1} \times A_{\lambda 2} / ((\epsilon_{RED})_{\lambda 1} \times A'_{\lambda 2} - (\epsilon_{RED})_{\lambda 2} \times A'_{\lambda 1})] \times 100$ formülüne göre gerçekleştirildi.

2.5. *P. turionellae* Venomunun Konak Böcek Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

2.5.1. *P. turionellae* Venomunun Konak Böcekte Lethal ve Sublethal Dozlarının Belirlenmesi

Parazitoit venomunun konak *G. mellonella* pupaları üzerinde doza bağlı toksik ve insektisidal etkisini belirlemek amacıyla 40 dişi bireyden elde edilen venom kesesi içeriği böcek fizyolojik tamponu (ISB) içinde çözündürülerek, farklı protein dozlarında (0, 0,125 0,25, 0.5, 1, 2 ve 4 µg/µl) hazırlandı. Venom solüsyonları hazırlandıkları gün bekletilmeden doz belirleme deneylerinde kullanıldı. Tüm deneylerde konağın 80-100 mg ağırlığındaki pupaları kullanıldı. Her venom dozu için 5 pupaya 10 µl’lik Hamilton marka mikroenjektör ile 2 µl venom solüsyonu edildi. Enjeksiyon yeri olarak puplarda abdomenin son iki segmentleri arası tercih edildi. Beşer bireyden oluşan deneyler, tüm venom dozları için üçer defa tekrar edildi. Ayrıca, kontrol gruplarının oluşturulmasında puplara 2 µl ISB enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyon yapılan puplarda 30 dakika aralıklarla

dördüncü saatin sonuna kadar aktivite gözlemi yapılarak mekanik uyarıya cevap (MUC) oranları belirlendi. Böylece pupal felç oranlarına göre Probit analizi yapılarak uygun felç dozları belirlendi. Aynı zamanda, aynı puplar 5 cm çapındaki petri kaplarına alınarak 30 gün boyunca günlük olarak gözlemlendi ve venom dozuna bağlı pupal mortalite oranları belirlendi. Böylece venomun insektisidal dozları olan lethal doz (LD₉₉) ve ortalama lethal doz (LD₅₀) probit analizi ile belirlendi. Belirlenen bu değerlere göre ortalama lethal dozun (LD₅₀) altında kalan 3 farklı doz (0,125 µg/2µl, 0,25 µg/2µl, 0,5 µg/2µl) ile genotoksisite analizleri gerçekleştirildi.

2.5.2. *P. turionellae* Venom Uygulamasına Bağlı Konak Böcekteki Lethal Zamanının Belirlenmesi

Parazitoit venomunun konak *G. mellonella* pup evresi üzerinde etkili olan lethal dozların belirlenmesinde olduğu gibi aynı venom dozlarına (0-4 µg/µl) maruz kalan puplarda lethal zamanın belirlenmesi için de probit analizi yapıldı. Bu amaçla her bir dozun enjeksiyonunu takiben puplar günlük olarak gözlemlenerek 30 gün sonunda erginleşmeyen puplar ölü olarak kayıt edildi. Böylece pupal ölüm oranlarının zamana bağlı değerlendirmesi yapıldı.

2.5.3. Venomun Sublethal Dozlarının Konak Puplarına Uygulaması ve Hemolenf Toplama

Venomun konak *G. mellonella* pupal hemositleri üzerindeki genotoksisitesinin belirlenmesi için belirlenen dozlardaki (0,125 µg/2µl, 0,25 µg/2µl, 0,5 µg/2µl) venom örnekleri hazırlandı. Pupal hemositlerin eldesi için sublethal dozlardaki venom örnekleri 80-100 mg ağırlığındaki puplara enjekte edildi. Venomun pupal lethal zaman verilerine ve hücre döngüsü süreleri göz önünde bulundurularak belirlenen sürelerde enjeksiyon yapılan puplardan hemolenf örnekleri alındı. Bu nedenle her bir venom dozu ve kontrol grubu için enjeksiyondan 2, 4 ve 24 saat sonra hemolenf toplandı. Hemolenf almak amacıyla pupların dış yüzü alkolle temizlendi ve ardından enjeksiyon yapılan yerden delinerek 10 µl hemolenf mikropipet yardımıyla alınarak COMET ve mikronukleus testinde kullanıldı.

2.5.4. COMET Assay (Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (SCGE) Yöntemi)

DNA hasarının belirlenmesi amacıyla, Comet Analizi (Tek Hücre Jel Elektrofrezisi), Singh vd., (1988) tarafından belirlenmiş ve modifiye edilmiş prensiplere

göre alkali ortamda gerçekleştirildi. Sublethal dozlarda ve zamanlarda venom enjeksiyonuna maruz kalan pupların her birinden mikropiller tüp ile toraksından 10 µl hemolenf alınarak ependorf tüplerine toplandı. Bu tüpler buz içerisinde ve karanlıkta muhafaza edildi. Hemolenf örneklerinin üzerine 90 µl % 1'lik düşük kaynama dereceli agaroz (LMPA) ilave edilerek, üzeri önceden % 1'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) ile kaplanmış özel lamlara yerleştirildi. Agaroz jele gömülen bu karışımdaki hemositler, hipertonic bir lizis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 0,25 M NaOH, %1 TritonX-100 ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO), pH: 10,0) tamponu ile muamele edildi ve non-iyonik deterjan ile hücre membranları, sitoplazma, nükleoplazma gibi yapılar uzaklaştırılarak nükleozomlar çözündürüldü. Geriye kalan nükleoidler, yüksek alkali özelliğindeki bir solüsyonla muamele edildi, DNA'nın süperkoil yapısı gevşetildi. Bu sayede kırık bölgeler olan apürinik/apirimidinik bölgeler açığa çıkarıldı. Bu kırıkların görüntülenmesi için, hemolenf örneklerinin yüklendiği lamlar, içerisinde elektroforez tamponu (10N NaOH ve 200 mM EDTA, pH: 13,0) bulunan tank içerisine alınarak 25 Volt ve 300 mA'de anoda doğru göç ettirildi. Ardından lamlar nötralizasyon için 4 °C'de 15 dak. 0,4 M Tris-HCl (pH: 7,4) tamponu içerisinde bekletildi ve DNA kırıklarının görüntülenmesi için SYBR Green ile boyama yapıldı. DNA kırıklarının görüntülenmesi için slaytlar floresan mikroskopta 40X'lik objektif altında fotoğraflanarak bilgisayarda COMET ASSAY IV (Perceptive Instruments Ltd, UK-İtalya) programı kullanılarak analiz edildi.

Comet Assay IV programında genotoksik etkinin belirlenmesi amacıyla otomatik ölçüm yapılarak % DNA Tail (Tail Intensity, Kuyruk Yoğunluğu), Tail Moment (Kuyruk Momenti) ve Tail Migration (Kuyruk Göçü) parametreleri kullanıldı. Olive vd., (1990)'in tanımına göre kuyruk momenti, kuyruk uzunluğunun kuyruktaki floresan yoğunluğu veya göç bölgesindeki DNA yüzdesi ile çarpımından elde edilmektedir. Her bir dozdaki DNA hasar tespiti için 5'er pup kullanılarak 3 tekrar yapıldı. Her doz için toplam 750 hücre sayımı yapıldı.

2.5.5. Mikronukleus Assay

Venomun konak üzerindeki genotoksik hasarının belirlenmesi ve Comet yönteminden elde edilen verilerin karşılaştırılması için Venier vd., (1997) tarafından belirlenen mikronukleus testi yapıldı. Venom uygulamasına maruz kalan pupların her birinden mikropiller tüp ile toraks ekstremit kaidelerinden 10 µl hemolenf alındı.

Alınan hemolenf örnekleri direkt olarak lam üzerine yayıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminin arkasından lamalar 5 dak. süresince taze hazırlanmış glasiyel asetik asit/ metanol (1:3) karışımı ile fikse edildi. Fiksatiften çıkarılan lamlardan fiksatif kuruduktan sonra mikronukleusların görünür hale gelmesi için % 10'luk Giemsa boyası ile 15 dakika boyama işlemi yapıldı. Boyama işleminin hemen ardından lamalar hızlı bir şekilde distile su ile yıkanarak ve ışık mikroskobunda 100X büyütme ile mikronukleus sayımı yapıldı. Sayım sırasında ana çekirdek ile aynı renkte, fakat 5 kat daha küçük olan mikronukleus sayımı yapıldı. Her bir doz için 5'er pup kullanıldı ve 3 tekrar yapıldı. Her doz için toplam 1500 hücre sayımı gerçekleştirildi.

2.6. Venom Sublethal Dozlarının ve Parazitlemenin Konakta Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi

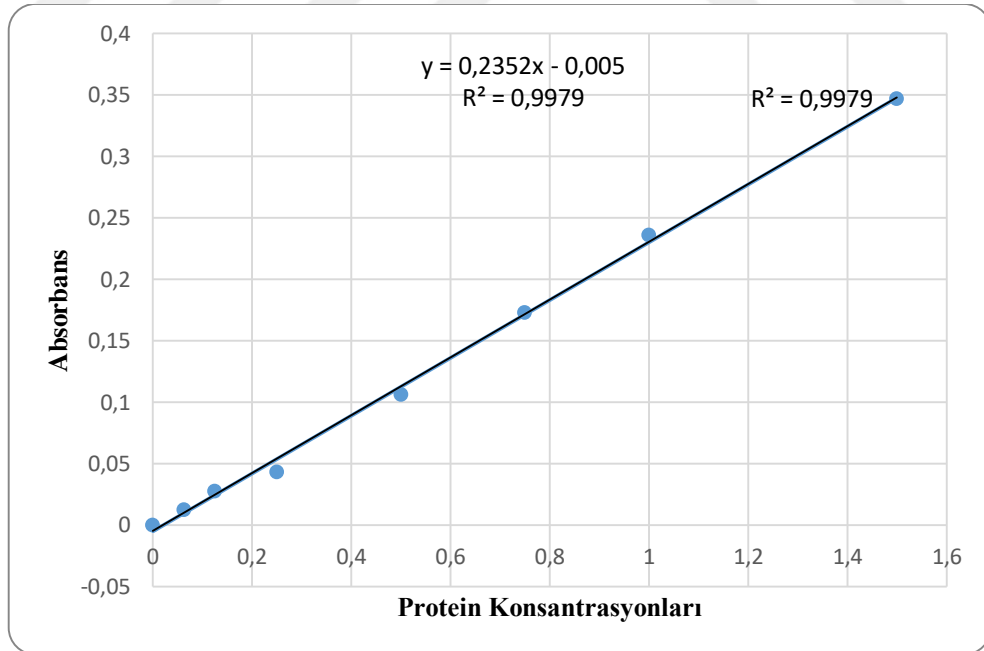
2.6.1. Venomun Konak Puplarına Uygulanması, Hemolenf Toplama ve Homojenizasyon

Venomun konak böcek antioksidan sistemi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için venom enjeksiyonu (0,5 µg/2µl, 0,25 µg/2µl ve 0,125 µg/2µl) yapılmış puplar kullanılarak antioksidan enzim aktivitesi deneyleri gerçekleştirildi. Hemolenf eldesi için sublethal dozlardaki venom enjekte edilen puplardan lethal zamana göre belirlenen saatlerde (1., 2. ve 4.) hemolenf örnekleri alındı. Hemolenf almak amacıyla pupların dış yüzü alkolle temizlendi ve ardından enjeksiyon yapılan yerden delinerek 10 µl hemolenf mikropipet yardımıyla alınarak toplam 10 puptan alınan hemolenf örnekleri içinde 1mg 2-kloro-4-piridinil -N'-fenilüre bulunan mikrotüplere toplandı. Tüm hemolenf örnekleri toplam hemolenf protein miktarı ve enzim aktivitesinin belirlenmesi deneylerinde kullanılmak amacıyla homojenize edilene kadar -80 °C'de saklandı. Homojenizasyon için toplanan hemolenf örneklerindeki protein miktarı tayini, KAT, GST ve SOD aktivite analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla soğuk homojenizasyon tamponu (50mM Fosfat tamponu, 150 mM NaCl pH:7,4) kullanıldı. Hemolenf örneği ile 1:1 oranında soğuk homojenizasyon tamponu karıştırıldıktan sonra 10,000 g +4 °C'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant bekletilmeden enzim aktivitesi deneylerinde kullanıldı. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi için MDA miktarının ölçümü analizinde ise 25µl hemolenf örnekleri direkt olarak alınarak 700 g +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak MDA miktar tayini deneyinde kullanıldı.

Tüm venom dozları ve kontrol grubu için her tekrarda 10'ar pup kullanılarak analizler 6 kez tekrar edildi.

2.6.2. Protein Miktar Tayini

G. mellonella puplarında spesifik antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla hemolenfteki total protein miktarının belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanıldı. Standart protein olarak kullanılan BSA (bovine serum albümin)'nin belirli dozları (0,1-1,4 mg/ml) homojenizasyon tamponu içinde hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltilerinden 5'er µl alınarak üzerlerine 250 µl Bradford reaktifi eklendi ve 5 dakika sonra BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında - Gen 5 programında protein miktarları 595 nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerinden kör değerleri çıkarılarak gerçek absorbans değerleri elde edildi. Gerçek absorbans değerleri kullanılarak oluşturulan standart grafiğine ait $y = 0,2352x - 0,005$ ($R^2 = 0,9979$) formülü elde edildi ve bu formül deney gruplarına ait hemolenfte bulunan protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla kullanıldı (Şekil 2.1). 1:10 oranında homojenizasyon tamponuyla sulandırılan hemolenf örneklerinin toplam protein miktarı (mg/ml) ise yukarıda bahsedildiği gibi standart grafik denkleminde göre belirlendi.



Şekil 2. 1. BSA ile oluşturulan protein standart eğri grafiği

2.6.3. Katalaz

Venomun sublethal dozlarının uygulaması ve parazitlemeye bağılı olarak *G. mellonella* pup hemolenfinde KAT (EC 1.11.1.6) enzim aktivitesinin belirlenmesi Chance ve Maehly (1955) tarafından belirlenen yöntemle gerçekleştirildi. Katalazın hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene yıkım hızının hesaplandığı bu metotta *G. mellonella* hemolenfinde bulunan KAT enzim aktivitesinin belirlenmesi için enzim aktivitesi kuvars küvet içerisinde gerçekleştirildi. 1350 µl Fosfat tamponu (pH: 7,0), 150 µl hidrojen peroksit ve son olarak reaksiyonun başlaması 10 µl numuneden kullanılarak hızlı bir şekilde karıştırılması sağlandı (Tablo 2.2) ve okuma gerçekleştirildi. Kör olarak ise numune yerine 10 µl fosfat tamponu eklenmiştir. Katalaz enzim aktivitesinde azalan hidrojen peroksit miktarının ölçümü 240 nm’de 10 saniyede bir olacak şekilde BİO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu Cihazda Gen 5 programı kullanılarak kinetik ölçüm yapıldı.

Elisa cihazının kuvvet ölçümü kısmında tekli ışık yoluna sahip olması nedeniyle örneklerle ait okuma yapılmadan önce boş kuvars küvet ardından fosfat tamponu ile kör okuması yapıldı. Köre ait absorbans değeri, örneklerle ait absorbans değerlerinden çıkarılarak gerçek absorbans değerleri elde edildi. Kontrol ve deney gruplarına ait elde edilen gerçek absorbans değerlerinden birim zaman başına azalan absorbans değişimleri tespit edildi. Elde edilen azalış miktarları ve sabit sayı (ϵ_{240} : 0,0394 mM⁻¹ cm⁻¹) kullanılarak katalaz enzim aktivitesi U/mg protein olarak hesaplandı.

Tablo 2. 2. Katalaz aktivite ölçümü bileşenleri

	KÖR	NUMUNE
Fosfat tamponu (pH: 7,0)	1350 µl	1350 µl
Hidrojen peroksit (30 mM)	150 µl	150 µl
Fosfat tamponu (pH: 7,0)	10 µl	--
Enzim kaynağı	--	10 µl

2.6.4. Glutatyon S Transferaz

Venomun sublethal dozlarının enjeksiyonuna ve parazitlemeye bağılı olarak *G. mellonella* pup hemolenfinde gözlenen GST (EC 2.5.1.18) enzim aktivitesindeki değişiklikler Habig vd., (1974) tarafından gerçekleştirilen 1-chloro-2,4-dinitrobenzen

(CDNB)'nin redükte glutatyon ile konjügasyonunu katalize eden toplam GST (mikrozomal ve sitozolik) aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde artan konjüge CDNB'nin ölçülmesi amacıyla 100 µl 100 mM CDNB, 100 µl 1000 mM GSH (glutatyon) ve kullanılarak bir karışım hazırlandı. Karışımdan 200 µl alınarak enzim kaynağı olarak kullanılan 10µl numunenin üzerine eklendi ve 340 nm'de 30 saniyede bir olacak şekilde kinetik ölçüm yapıldı. Kör olarak kokteylin oluşturulmasında kullanılan PBS (pH: 6,5) 10 µl olacak şekilde enzim kaynağı yerine kullanıldı (Tablo 2.3). CDNB'nin redükte glutatyon ile reaksiyona girmesine bağlı olarak oluşan tioether yapısının yükselen absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen absorbans değerlerinden ϵ_{340} : 0,00503 μM^{-1} katsayısı kullanılarak birimi $\mu\text{mol/mg}$ protein/dak olan enzim spesifik aktivitesi hesaplandı. Kör ve homojenatların dilüsyonunda ise fosfat tamponu (PBS) (pH: 6,5) kullandı.

Tablo 2. 3. *Glutatyon-S-transferaz aktivite ölçümü bileşenleri*

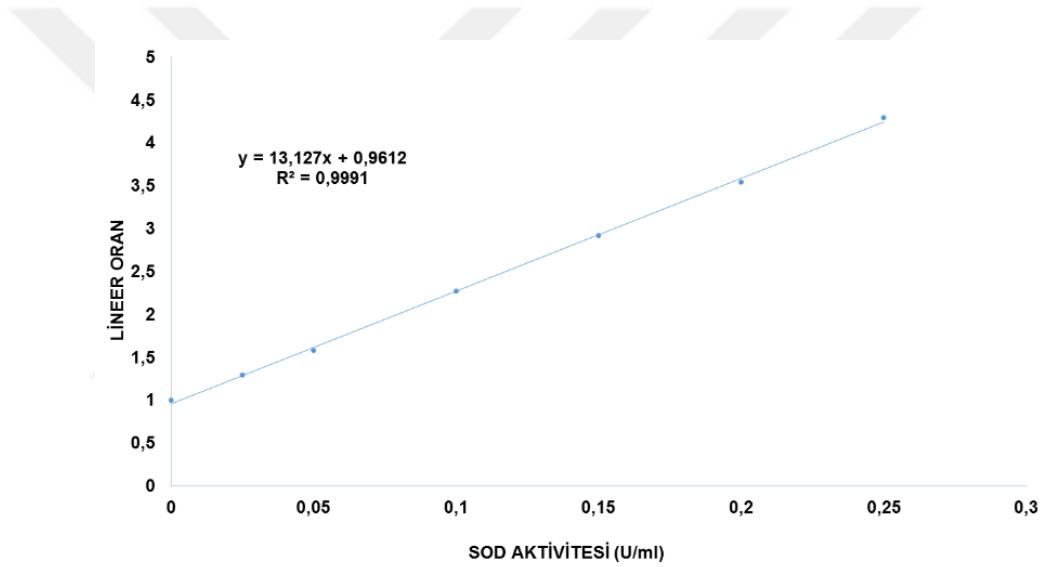
	KÖR	NUMUNE
Karışım	180 µl	180 µl
Fosfat tamponu (pH: 6.5)	20 µl	---
Enzim kaynağı	---	20 µl

2.6.5. Süperoksitdismutaz

Venom uygulanan ve ISB uygulanan *G. mellonella* pup hemolenfinde SOD (EC 1.15.1.1.) enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Mccord ve Fridovic (1969) tarafından geliştirilen yöntemin esas alındığı ticari kit kullanıldı. Bu yöntem, SOD enziminin, süperoksit radikallerinin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandırması esasına dayanmaktadır. Böylece ksantin ve ksantinoksidaz (XOD) kullanılarak 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorür ile tepkimeye giren ve kırmızı renkli formazon boyası oluşturan süperoksit radikalleri ölçüldü.

SOD aktivitesinin belirlenmesinden önce ticari kit (CAYMAN, 706002) içerisinde verilen stok SOD enzimi kullanılarak standart çözeltiler (0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 ve 0,25 U/ml) hazırlandı. Standart çözeltiler kitte verilen oranlara göre (Tablo 2.4) mikropate içerisinde standart grafiğinin oluşturulması amacıyla ölçüldü. Bu

işlemler sırasında hazırlanan standart analiz karışımları oda sıcaklığında (karanlıkta) 20 dak. inkübe edildi. İnkübasyon işleminin ardından 460 nm’de BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında Gen 5 programında ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri kitte verilen formüle göre lineer oran hesaplanmasında kullanıldı. Lineer oran hesaplaması ise, içerisinde enzim bulunmayan standart çözeltisine (0 U/ml = standart A) ait absorbans değerinin sırayla diğer standartlara ait absorbans değerlerine bölünmesi ile elde edildi. Lineer oranlar ve SOD aktivitesi standart doğru denkleminin oluşturulmasında kullanıldı ve $y = 13,127x + 0,9612$ ($R^2 = 0,9991$) formülü elde edildi (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. SOD standart eğri grafiği

Kontrol ve deney gruplarına ait SOD enzim aktivitesinin belirlenmesinde ise homojenize edilen hemolenf örnekleri kullanıldı. Hemolenf örneklerine ait absorbans değerlerinin standart grafiğin aralığına girmesini sağlamak için 1 µl homojenat, 149 µl kite ait örnek tamponu ile dilüe edildi. Bu işlemin ardından standartlara uygulanan ve tablo 2.4’de verilen değerlere göre analiz karışımı mikropate içerisinde oluşturuldu. 20 dakikalık karanlıktaki inkübasyonun ardından 460 nm’de BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında okuma yapıldı. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen absorbans değerleri lineer oranların belirlenmesinde kullanıldı. Örnekler için oluşturulan lineer oranlar, standart A absorbansının örnek absorbansına bölünmesi ile elde edildi. Lineer oran/ SOD aktivitesi doğru denklemi aracılığıyla örnekler için enzim aktiviteleri U/ml olarak hesaplandı. Örnekler için spesifik enzim aktivitesinin

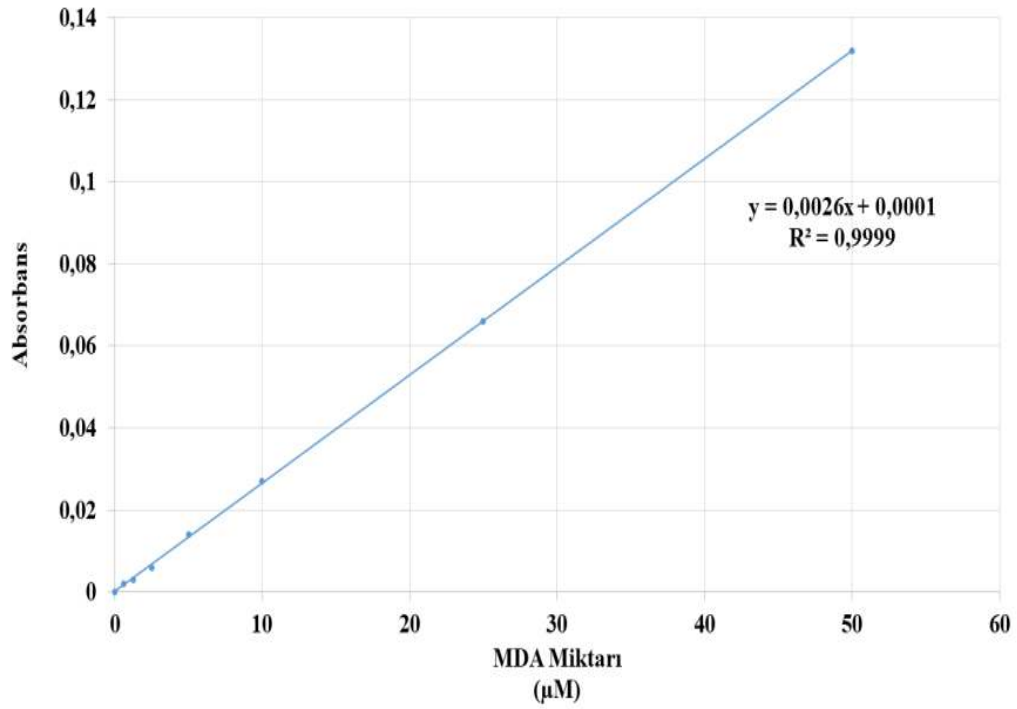
belirlenmesi ise Bradford yöntemi ile elde edilen protein miktarları kullanılarak nmol/mg protein birimi olarak hesaplandı.

Tablo 2. 4. Süperoksit dismutaz aktive ölçümü bileşenleri (1 adet mikropate kuyucuğu için)

	STANDART	NUMUNE
Radikal dedektör	200 µl	200 µl
Standart çözelti	10 µl	---
Enzim kaynağı	---	10 µl
Ksantinoksidaz	20 µl	20 µl

2.6.6. Malondialdehit

Venom uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* pupalarında ortaya çıkan oksidatif stresin belirlenmesi amacıyla lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA miktarının tayininde Yagi (1998)'nin geliştirmiş olduğu metoda bağlı ticari kit (CAYMAN 10009055) kullanıldı. MDA miktar tayinin yapılabilmesi için ilk olarak kitte verilen aralıkta (0-50 µM) standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.3) ve bu grafiğe ait doğru denklemi elde edildi. Lipid peroksidasyonunu gösteren MDA'nın miktar tayini için ticari kit içerisinde verilen 25 µl standart veya homojenat, 25 µl SDS ve 1 ml renklendirme reaktifleri (TBA asetik asit, TBA sodyum hidroksit) santrifüj tüpü içerisine alındı. Elde edilen bu karışım ilk olarak 1 saat 100 °C'ye ayarlanmış su banyosunda MDA'nın hücre dışına çıkarılması sağlandı. Ardından 10 dak. 4 °C'de inkübe edilerek reaksiyon durduruldu. Bu işlemin ardından diğer hücre komponentlerin uzaklaştırılması amacıyla santrifüj edilen örnekler ait süpenatanlar (pembe renkli) elde edildi. Okumadan önce oda sıcaklığında 30 dak. boyunca ikinci bir inkübasyon gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından her bir örneğe ait solüsyondan 150 µl mikropate içerisine alındı ve BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında Gen 5 programında 535 nm'de okuma yapıldı. *G. mellonella* pupal hemolenfinde bulunan MDA miktarlarının hesaplanması amacıyla standart doğru grafiğinden elde edilen $y = 0,0026x + 0,0001$ ($R^2 = 0,999$) formülü kullanılarak ortaya çıkan sonuçlar nmol/mg olarak hesaplandı.



Şekil 2. 3. MDA standart grafiği

2.7. İstatistik

Venom dozlarına maruz kalan C6 hücrelerinde yapılan MTT ve Alamar Blue analizlerinden elde edilen verilerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Bu nedenle analiz sonuçlarına parametrik bir test olan One-Way Anova uygulanarak, LSD (Least Significant Difference) testi ile güvenilirlik analizleri yapıldı (Windows versiyon 18,0, SPSS, Chicago, IL). Ayrıca deneysel grupların kontrole göre olan farklarının test edilmesi amacıyla Dunnett testleri kullanıldı. Zamana bağlı toksisite arasındaki değişim ise t-testi kullanılarak yapıldı.

Venomun lethal ve sublethal dozlarının belirlenmesinde ise SPSS programı kullanılarak Probit analizi yapıldı.

Hemolenf örneklerinden elde edilen protein ve enzim aktivitesi verilerinin dozlara ve zamana göre analizinde ise normal dağılım gösterdiği tespit edilen sonuçlar Parametrik testlerden biri olan One-way Anova uygulanarak LSD testi ile güvenilirlik analizleri yapıldı (Windows versiyon 18,0, SPSS, Chicago, IL).

Genotoksik hasarın belirlenmesi için yapılan Comet ve Mikronukleus analizlerinde ise sonuçların Normal dağılım göstermediği tespit edildikten sonra Non-

parametrik testlerden biri olan Kruskal-Wallis uygulanarak, Mann Whitney testi ile grupların ikişer gruplar halinde güvenilirlik analizleri yine SPSS programında yapıldı.

Tüm sonuçların %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı olup olmadıkları sınıandı ve $p < 0,05$ düzeyinde ise anlamlı olarak kabul edildi.

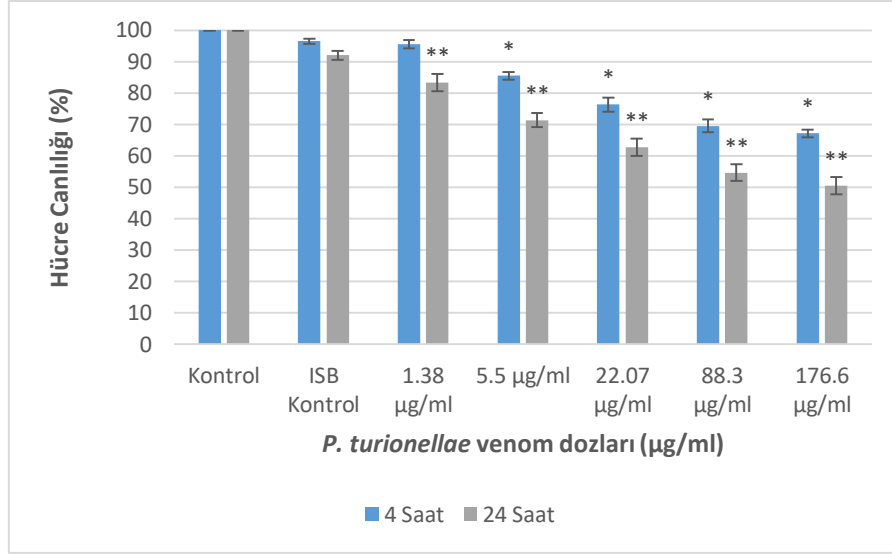


3. BULGULAR

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. MTT Analizi

Farklı zaman dilimlerinde (4. ve 24. saat) C6 glioblastoma hücreleri üzerine belirlenen dozlarda uygulanan *P. turionellae* venomunun sitotoksitesitesi ve hücre ölüm oranı üzerine etkileri Şekil 3.1’de verilmektedir. Hücresel canlılık oranı her iki uygulama saatlerinde de hem kontrol hem de ISB kontrolü arasında anlamlı bir değişim göstermedi. 4 saat boyunca venoma maruz kalan hücrelerin ölüm oranlarında 1,38 µg/ml hariç kontrole kıyasa anlamlı artış tespit edildi ($F= 64,932$, $df= 6,105$, $p= 0,000$). 24 saat süresince belirlenen venom dozlarına maruz kalan hücrelerin ölüm oranları ise kontrole göre istatistiksel olarak farklılık gösterdi ve anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($F= 59,294$, $df= 6,105$, $p= 0,000$). Hücresel canlılık oranının kontrole göre, en yüksek dozda ve 4. saatte yaklaşık %67’e kadar azaldığı görülürken, 24. saatin sonunda bu oran yaklaşık %51 oranında tespit edildi. Sonuç olarak 24. saatte uygulanan en yüksek dozun (176,6 µg/ml) ortalama lethal doz (LD_{50}) olduğu, diğer dozların ise sublethal dozlar olduğu çalışma kapsamında belirlendi. Ayrıca çalışmamız kapsamında hem venom dozları hem de kontrol grupları arasındaki istatistiksel değişimler LSD testine göre yapılarak, Tablo 3.1.’de verildi. Bu analize göre her iki uygulama süresinde de tüm dozların hem kontrol hem de ISB’den farklı olduğu, dozlar arasında ise 83,3 ve 176,6 µg/ml hariç tüm dozların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi. Zamana bağlı olarak hücre ölüm oranlarının ise kontrol grubu hariç tüm gruplarda hem 4. saat hem de 24. saat arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$, t-testi). Bu nedenle 24. saatte 4. saate göre hücresel canlılık önemli oranda azaldı.



Şekil 3. 1. Farklı zaman dilimlerinde (4 ve 24. saat) uygulanan *P. turionellae* venom dozlarının C6 glioblastoma hücre canlılığı üzerine etkileri (MTT analizi)

*Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$, ANOVA, DUNNETT).

**Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$, ANOVA, DUNNETT).

Tablo 3. 1. *P. turionellae* venom dozlarının C6 glioblastoma hücre canlılığı üzerine etkileri (4. ve 24. saat)

Venom Doz (µg/ml)	Hücresel Canlılık Oranı Ortalama ± SH	
	4. Saat	24. Saat
Kontrol	1,00 ± 0,06 ax	1,00 ± 0,053 ax
ISB kontrol	0,97 ± 0,04 ax	0,91 ± 0,07 ay
1,38 µg/ml	0,96 ± 0,08 ax	0,83 ± 0,12 by
5,5 µg/ml	0,86 ± 0,05 bx	0,71 ± 0,09 cy
22,07 µg/ml	0,76 ± 0,09 cx	0,63 ± 0,11 dy
88,3 µg/ml	0,70 ± 0,08 dx	0,55 ± 0,11 ey
176,6 µg/ml	0,67 ± 0,05 dx	0,51 ± 0,11 ey

*Aynı sütunda farklı harfle (a-e) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$, ANOVA, LSD).

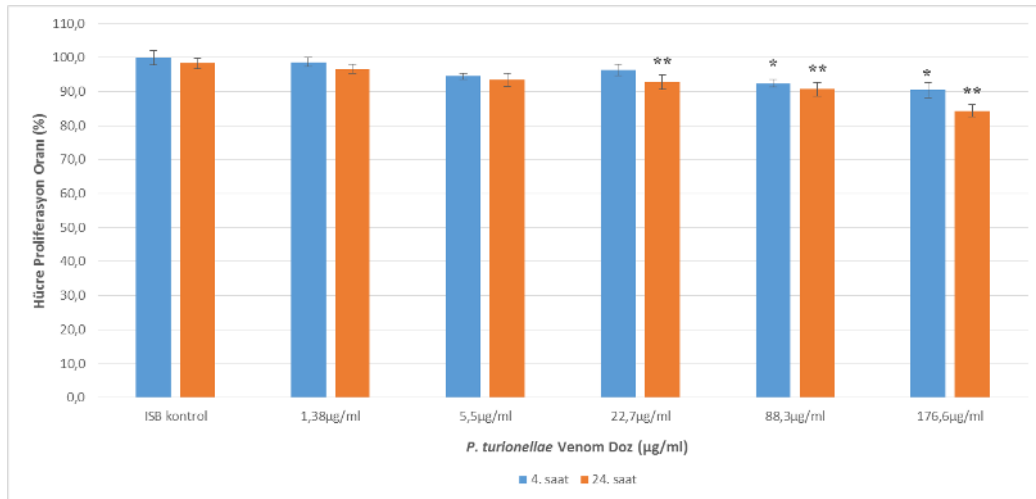
**Aynı satırda farklı harfle (x-y) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$, t-Testi).

*Deney 4 tekrarlı olmak üzere her bir tekrar 4 kuyucuğa yapılan venom uygulaması sonucunda alınan verilerle hesaplandı ($p < 0,05$, ANOVA, LSD).

3.1.2. Alamar Blue Analizi

MTT analizi ile belirlenen sitoksisite verileri, hücrelere uygulanan ISB tamponu ile sadece DMEM-F12 eklenmiş kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdi. Bu nedenle Alamar Blue analizinden elde edilen verilerin istatistiksel analizinde yalnızca ISB kontrol olarak kullanıldı. ISB kontrol grubuna kıyasla 4. saatin 83,3 ve 176,6 µg/ml venom dozlarına ait hücre proliferasyon yüzdesinin önemli derecede azaldığı belirlendi (Şekil 3.2, Dunnett testi, $p < 0,05$). 24. saatte ise 22,07, 83,3, 176,6, µg/ml venom dozlarına maruz kalan C6 glioblastoma hücre proliferasyon yüzdesi ISB kontrole göre önemli seviyede azaldı. 4. ve 24. saatleri arasında ise sadece en yüksek doz olan 176,6 µg/ml'nin farklı olduğu, diğer dozların ise istatistiksel olarak farklı olmadığı tespit edildi (Tablo 3.2, t-testi).

Tablo 3.2'de de verildiği gibi hücre proliferasyon yüzdesinde 4 saatlik uygulamada venom dozları arasında önemli değişimler belirlenmezken, en düşük hücre proliferasyonu 176,6 µg/ml'lik venom uygulanan grupta yaklaşık %90 olarak belirlendi. ($F = 4,999$; $df = 5,9$; $p = 0,000$). 24. saatte ise 22,07, 83,3 ve 176,6 µg/ml venom uygulanan hücrelerin proliferasyon yüzdesinin hem kontrolden hem de diğer dozlardan istatistiksel olarak farklı olduğu belirlendi ($F = 7,413$; $df = 5,9$; $p = 0,000$). C6 glioblastoma hücre proliferasyon yüzdesinin 24. saatte ve en yüksek dozda %84,3 seviyesine kadar düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 3. 2. Farklı zaman dilimlerinde (4 ve 24. Saat) uygulanan *P. turionellae* venom dozlarının C6 glioblastoma hücre proliferasyonu üzerine etkileri (Alamar Blue analizi)

*Kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$, ANOVA, DUNNETT).

**Kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$, ANOVA, DUNNETT).

Tablo 3. 2. *P. turionellae* venom dozlarının C6 glioblastoma hücre proliferasyonu üzerine etkileri (4. ve 24. saat)

Venom Doz (µg/ml)	Hücre proliferasyon oranı (%)	
	Ortalama ± SH	
	4 Saat	24 Saat
ISB kontrol	100,00 ± 2,08 ax	98,29 ± 1,54 ax
1,38µg/ml	98,69 ± 1,29 ax	96,69 ± 1,37 ax
5,5µg/ml	94,50 ± 0,93 abx	93,47 ± 1,93 ax
22,7µg/ml	96,41 ± 1,69 ax	92,89 ± 2,14 bx
88,3µg/ml	92,36 ± 1,12 bx	90,75 ± 1,99 bx
176,6µg/ml	90,54 ± 2,24 bx	84,31 ± 1,80 cy

*Aynı sütunda farklı harfle (a-e) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$, ANOVA, LSD).

**Aynı satırda farklı harfle (x-y) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$, t-Testi).

*Deney 4 tekrarlı olmak üzere her bir tekrar 4 kuyucuğa yapılan venom uygulaması sonucunda alınan verilerle hesaplandı ($p < 0,05$, ANOVA, LSD).

3.2. *P. turionellae* Venomunun Konak Böcek Üzerine Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.1. *P. turionellae* Venomunun Konak Böcekte Lethal-Sublethal Dozların ve Lethal Zamanın Belirlenmesi

Parazitoit venomunun farklı dozlarının (0-4 µg/µl) konak *G. mellonella* pupaları üzerinde doza bağlı toksik ve insektisidal etkisini belirlemek amacıyla puplara yapılan enjeksiyonlardan sonra tüm pupların mekanik uyarıya cevap (MUC) oranları 24. saatin sonuna kadar belirlendi. Aynı zamanda, aynı puplar 30 gün boyunca kontrol edildi ve venom dozuna bağlı pupal mortalite oranları probit analizi ile belirlendi. Böylece venomun insektisidal dozları olan lethal doz (LD₉₉) 1,17 µg/2µl ve ortalama lethal doz (LD₅₀) 0,44 µg/2µl olarak tespit edildi. Belirlenen bu değerlerin güven aralıkları da göz önüne alındığında LD₁₀, LD₃₀ ve LD₅₀ (0,125 µg/2µl, 0,25 µg/2µl, 0,5 µg/2µl) dozlarının genotoksisite analizlerinde uygun dozlar olduğuna karar verildi (Tablo 3.3).

Tablo 3. 3. Farklı dozlarda venom uygulanan *G. mellonella* pupal evresinde lethal dozlar (LD_x)

Lethal Doz Seviyesi (µg/pup(2µl))						
					%95 Güven Aralığı* (CL)	
Venom Dozları	Uygulama Yapılan Pupa Sayısı	Ölen Pupa Sayısı	Lethal Dozlar (LD)	Probit Dozlar	Alt Sınır	Üst Sınır
ISB	40	3	LD ₁₀ (%95 CL)	0,04	0,09	0,13
0,125	40	7	LD ₂₀ (%95 CL)	0,17	0,14	0,24
0,25	40	12	LD ₃₀ (%95 CL)	0,27	0,20	0,34
0,5	40	21	LD ₄₀ (%95 CL)	0,36	0,29	0,43
1	40	39	LD ₅₀ (%95 CL)	0,44	0,37	0,52
2	40	40	LD ₉₅ (%95 CL)	0,96	0,82	1,18
4	40	40	LD ₉₉ (%95 CL)	1,17	0,99	1,46

*%95 alt ve üst güven sınırları ile birlikte gösterildi

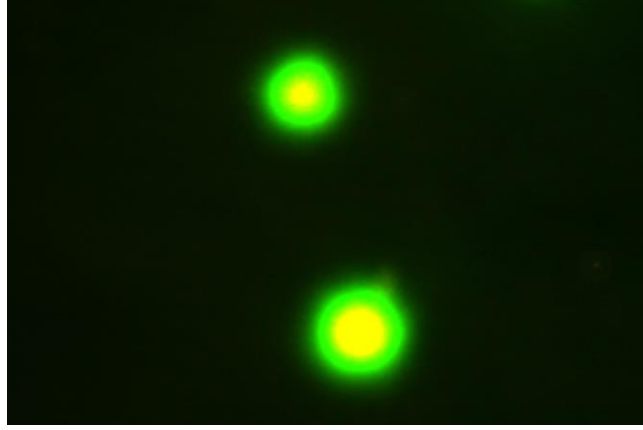
Lethal dozların belirlenmesinin ardından, uygulanan venom dozlarının pupal lethal zamanlarının belirlenmesi için de probit analizi yapıldı. LD₅₀ konsantrasyonunun altında kalan dozlarda MUC oranlarına (Tablo 3.4) bakıldığında 2, 4, 6, 8 ve 24. saatlerde önemli azalmalar tespit edildi. Bu nedenle 1. 2. ve 4. saat enzim aktivitesi deneylerinde kullanıldı. Genotoksik hasarın belirlenmesinde kullanılan saatlere karar verilirken ise genotoksik hasarın gözlemlenebilmesi için hücrelerin en az bir hücre döngüsü geçirmesi gerektiği düşünüldüğünden 2. 4. ve 24 saatlik bekleme süreleri kullanıldı.

Tablo 3. 4. Venom dozuna bağı pupal MUC, ergin olma süresi ve oranı

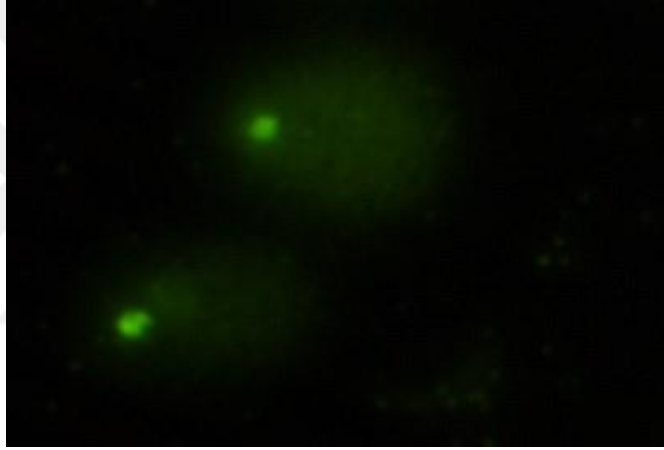
Venom dozu (µg/pup(2µl))	Pupal Ağırlık (mg) ORT±SH*	MUC Oranı (Geçen süreye göre %)								Ergin olma süresi (gün)	Ergin olma oranı %	Felç zamanı (saat)
		15'	30'	60'	120'	240'	360'	480'	1440'			
ISB	99,77 ± 1,68	100	100	100	100	100	100	100	100	7,79 ± 0,15	92,5	-
0,125	98,49 ± 1,37	100	100	100	97,5	80	75	70	60	8,29 ± 0,16	82,5	4,48
0,25	100,14 ± 1,37	100	100	100	97,5	72,5	65	60	50	7,73 ± 0,2	70	3,9
0,5	99,7 ± 1,32	100	100	97,5	95	62,5	55	52,5	40	7,33 ± 0,43	47,5	3,24
1	100,12 ± 1,34	100	100	95	82,5	52,5	45	42,5	30	8 ± 0	2,5	2,62
2	101,08 ± 1,51	100	97,5	90	67,5	37,5	27,5	25	10	-	0	1,46
4	101,14 ± 1,43	97,5	95	87,5	52,5	22,5	12,5	7,5	0	-	0	0,68

3.2.2. COMET Assay (Tek Hücre Jel Elektroföresi (SCGE) Yöntemi)

Venomun belirlenen dozlarının konak *G. mellonella*'nın hücrel immün savunmasında önemli fonksiyonları olan hemositleri üzerindeki genotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan COMET (tek hücre jel elektroföresi) analizinde (Görsel 3.1, Görsel 3.2) yaygın olarak kullanılan 4 farklı parametredeki değişiklikler tespit edildi. Bu parametrelerden kuyruk boyunun (µm) kontrol hemositlerine kıyasla bütün venom dozlarında önemli bir artış gösterdiği saptanırken ($\chi^2(\text{Kontrol})= 957,555$ $\chi^2(0,125) = 1465,502$ $\chi^2(0,25)= 1258,991$ $\chi^2(0,5) = 1562,159$; $df=2$; $p=0,00$), bu artışın venom uygulama süresine göre de devam ettiği belirlenmiştir. Venom uygulaması olmayan kontrol grubunda 4 ve 24 saat sonra kuyruk boyunda değişiklik olmazken, en yüksek dozda kuyruk yoğunluğunun yaklaşık olarak 3,5 kat kadar arttığı belirlendi (Tablo 3.5).



Görsel 3. 1. *COMET analizine ait SYBR Green ile boyanmış G. mellonella pupal hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri: DNA hasarı olmayan hemositler*



Görsel 3. 2. *COMET analizine ait SYBR Green ile boyanmış G. mellonella pupal hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri: DNA hasarı olan küçük baş ve yelpaze kuyruğa sahip hemositler.*

Tablo 3. 5. Kuyruk boyundaki doz ve saatlere bağılı değişimler

Kuyruk Boyu (Tail Length) (µm)			
ORT ± SH*			
Venom Doz (µg/2µl)	2. saat	4. saat	24. saat
Kontrol (ISB)	12,75 ± 0,15 ax	22,66 ± 0,23 ay	19,92 ± 0,17 ay
0,125	16,77 ± 0,13 bx	19,94 ± 0,21 by	39,96 ± 0,50 bz
0,25	20,84 ± 0,23 cx	29,13 ± 0,35 cy	50,04 ± 0,50 cz
0,5	23,51 ± 0,19 dx	41,54 ± 0,34 dy	69,67 ± 0,85 cz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$ Kruskal-Wallis, Mann Whitney).ORT: Ortalama; SH:Standart Hata.

Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann Whitney).ORT: Ortalama; SH:Standart Hata.

Diğer bir COMET parametresi olan Kuyruk Yoğunluğu (% DNA Tail) verilerinin de venom uygulanan ve uygulanmayan pupal hemositlerde önemli farklılıklar gösterdiği belirlendi. Kuyruk yoğunluğu hem doza hem de venom uygulama süresine bağılı olarak kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdi ($\chi^2(\text{Konrol})= 294,463$ $\chi^2(0,125) = 1329,489$ $\chi^2(0,25) = 128,192$ $\chi^2(0,5) = 348,741$ $df = 2$ $p = 0,00$). Kuyruk yoğunluğu venom uygulanmayan pupal hemositlerde %5 civarındayken, en yüksek venom dozuna 24 saat süresince maruz kalan pupal hemositlerde yaklaşık olarak % 62 oranına yükseldiği tespit edildi ($p \leq 0,05$, Tablo 3.6).

Tablo 3. 6. *Kuyruk yoğunluğundaki doz ve saatlere bağlı değişimler*

Kuyruk Yoğunluğu (% DNA Tail)			
ORT ± SH*			
Venom Doz (µg/2µl)	2. saat	4. saat	24. saat
Kontrol (ISB)	5,73 ± 0,21 ax	4,00 ± 0,09 ax	4,53 ± 0,13 ax
0,125	17,81 ± 0,35 bx	32,62 ± 0,45 by	45,51 ± 0,72 bz
0,25	39,01 ± 0,55 cx	44,89 ± 0,75 cy	48,67 ± 0,74 cz
0,5	40,69 ± 0,66 dx	53,54 ± 0,84 dy	62,88 ± 0,84 dz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$ Kruskal-Wallis, Mann Whitney).ORT: Ortalama; SH:Standart Hata.

#Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann Whitney).ORT: Ortalama; SH:Standart Hata.

COMET analizinde elde edilen parametrelerden kuyruk uzunluğunun, kuyruktaki floresan yoğunluğu veya göç bölgesindeki DNA yüzdesi ile çarpımı ile elde edilen Kuyruk momenti verileri de venom uygulanan ve uygulanmayan pupal hemositlerde önemli farklılıklar göstermiştir. Kuyruk momenti hem doza hem de venom uygulama süresine bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdi ($x^2(\text{Konrol})= 240,347$ $x^2(0,125) = 844,851$ $x^2(0,25) = 702,763$ $x^2(0,5) = 902,6$; $df = 2$; $p = 0,00$). Kuyruk momentindeki değişiklikler 2. saatte kontrole kıyasla en yüksek doz olan 0,5 µg/2µl’de yaklaşık 10 kat artarken bu fark aynı dozlar arasında 4. saatte 18 kat ve 24.saatte ise 36 kat artış gösterdi (Tablo 3.7).

Tablo 3. 7. Kuyruk momentindeki doz ve saatlere bağılı değişimler

Kuyruk Momenti (Tail Moment)(urbiturary unit)			
ORT ± SH*			
Venom Doz (µg/2µl)#	2. saat	4. saat	24. saat
Kontrol (ISB)	0,45 ± 0,02 ax	0,46 ± 0,01 ax	0,56 ± 0,02 ax
0,125	1,46 ± 0,03 bx	2,91 ± 0,05 by	8,82 ± 0,23 bz
0,25	3,49 ± 0,06 cx	6,66 ± 0,15 cy	11,16 ± 0,23 cz
0,5	4,43 ± 0,10 dx	8,42 ± 0,20 dy	20,37 ± 0,40 dz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$ Kruskal-Wallis, Mann Whitney) ORT: Ortalama; SH:Standart Hata.

Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann Whitney) ORT: Ortalama; SH:Standart Hata.

COMET analizindeki en önemli parametrelerden biri olan Kuyruk göçü (µm) ise, diğer genotoksisite indikatörlerinde olduğu gibi benzer değişimler göstermektedir. Kuyruk göçü hem doza hem de venom uygulama süresine bağılı olarak kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdi ($x^2(\text{Konrol})= 222,778$ $x^2(0,125) = 1466,183$ $x^2(0,25) = 1083,527$ $x^2(0,5) = 1226,616$; $df=2$; $p=0,00$). Kuyruk göçündeki değişiklikler 2. saatte kontrole kıyasla en yüksek doz olan 0,5 µg/2µl’de yaklaşık 13 kat artarken bu fark aynı dozlar arasında 4. saatte neredeyse 27 katına kadar ulaşırken 24. saatte ise 20 kat artış gösterdi (Tablo 3.8).

Tablo 3. 8. Kuyruk göçündeki doz ve saatlere bağlı değişimler

Kuyruk Göçü (Tail Migration) (μm)			
ORT $\pm$ SH*			
Venom Doz ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$)	2. saat	4. saat	24. saat
Kontrol (ISB)	0,96 $\pm$ 0,5 ax	2,00 $\pm$ 0,09 ax	2,53 $\pm$ 0,12 ax
0,125	4,40 $\pm$ 0,10 bx	32,62 $\pm$ 0,45 by	30,97 $\pm$ 0,47 bz
0,25	10,72 $\pm$ 0,19 cx	48,89 $\pm$ 0,75 cy	33,40 $\pm$ 0,46 cz
0,5	13,30 $\pm$ 0,24 dx	53,54 $\pm$ 0,84 dy	51,67 $\pm$ 0,79 dz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$ Kruskal-Wallis, Mann Whitney) ORT: Ortalama; SH: Standart Hata.

Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann Whitney) ORT: Ortalama; SH: Standart Hata.

3.2.3. Mikronukleus Assay

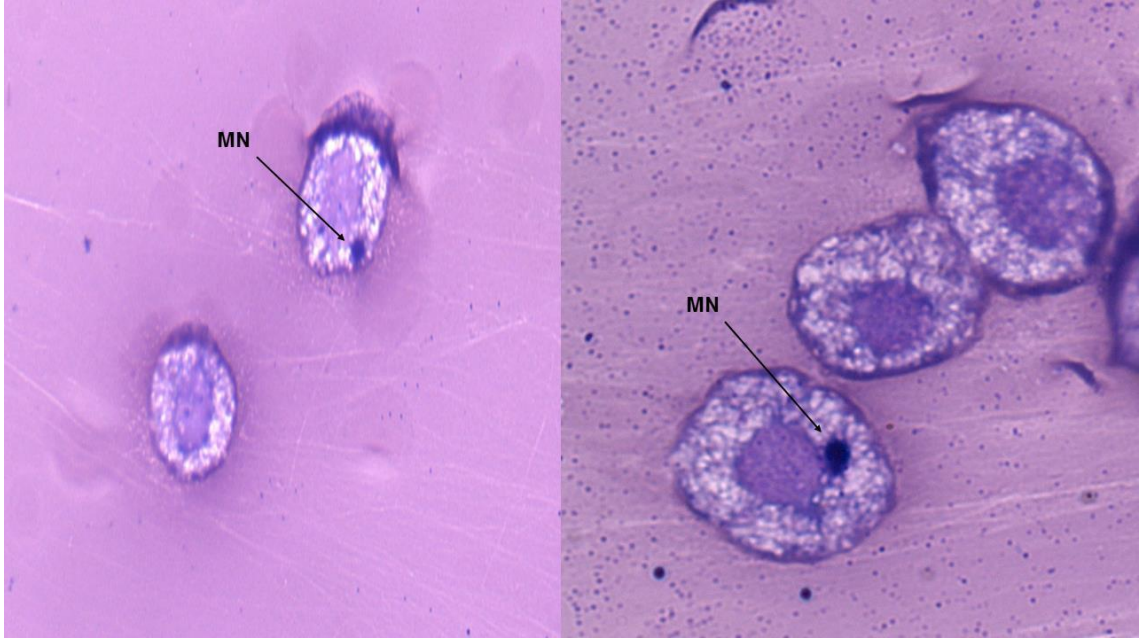
Belirlenen dozlarda venom uygulamasına maruz kalan *G. mellonella* puplarından elde edilen hemositlerde mikronukleus (Görsel 3.3) indeksinin doza bağlı olarak artış gösterdiği tespit edildi ($\chi^2(2.\text{saat}) = 49,591$ $\chi^2(4.\text{saat}) = 54,458$ $\chi^2(24.\text{saat}) = 55,819$; $df=3$; $p=0,00$). Venom uygulanmasından 2 saat sonra kontrol grubunda $\% 2,67 \pm 1,18$ olarak bulunan MN indeksi, 0,125, 0,25, 0,5 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ 'lik venom dozlarında sırasıyla $\% 20,00 \pm 2,00$, $\% 26,67 \pm 2,32$ $\% 48,00 \pm 2,23$ $\% 98,16 \pm 2,45$, $\% 132,44 \pm 2,37$ ve $\% 139,45 \pm 2,71$ olarak belirlendi. Kontrolün saatlere göre değişimine bakıldığında MN oranlarında bir değişim görülmedi. Ancak 0,125 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ venom dozunda uygulamadan 24 saat sonra MN indeksi yaklaşık 5 kat yükseldi. Saatlere bağlı bu yükseliş 0,25 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ve en yüksek doz olan 0,5 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ 'de de gözlenmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3. 9. *G. mellonella* puplarına farklı dozlarda uygulanan venoma bağlı olarak hemositlerde mikronukleus oluşumunda görülen değişimler

Mikronukleus ‰			
ORT ± SH*			
Venom µg/2µl [#]	2.Saat	4.Saat	24.Saat
Kontrol	2,67 ± 1,18 ax	2,67 ± 1,18 ax	2,67 ± 1,53 ax
0,125	20,00 ± 2,00 bx	29,33 ± 2,06 by	112,67 ± 4,83 bz
0,25	26,67 ± 2,32 bx	50,00 ± 2,18 cy	174,00 ± 4,0 cz
0,5	48,00 ± 2,23 cx	76,00 ± 2,90 dy	278,00 ± 9,01 dz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır (p <0,05, Kruskal-Wallis, Mann Whitney)

[#]Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır (p <0,05, Kruskal-Wallis, Mann Whitney)



Görsel 3. 3. Hemositlerin ve mikronukleusların Giemsa boyama yöntemi ile elde edilen mikroskopik görüntüsü (100X objektif)

3.3. *P. turionellae* Venom Dozlarının Konak *G. mellonella* Hemolenfinde Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkisinin Belirlenmesi

3.3.1. Pupal Hemolenfte Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Konak *G. mellonella* puplarından elde edilen hemolenf örneklerindeki toplam protein miktarı üzerinde hem uygulanan venom dozlarına hem de uygulama sürelerine göre istatistiksel olarak anlamlı değişimler saptandı (F (1.saat) = 1724,879, F (2.saat)= 419,868, F (4.saat) = 192,340; df=3, 20; p=0,000)). Uygulanan venom dozu yükseldikçe hemolenfteki total protein miktarı kontrole kıyasla anlamlı bir artış gösterdi. Ancak venom uygulama süresi arttıkça protein miktarının düştüğü tespit edildi (Tablo 3.10).

Tablo 3. 10. *P. turionellae* venomunun *G. mellonella*’nın pupal hemolenf protein miktarına etkileri

PROTEİN (mg/ml)			
ORT ± SH*			
Dozlar	1. Saat	2. Saat	4. Saat
Kontrol	24,09 ± 0,23 ax	25,40 ± 0,19ay	24,48 ± 0,27ax
0,125 µg/2µl	32,65 ± 0,16 bx	31,59 ± 0,30by	28,57 ± 0,19bz
0,25 µg/2µl	36,34 ± 0,05 cx	32,99 ± 0,05cy	29,32 ± 0,16cz
0,5 µg/2µl	37,33 ± 0,08 dx	33,77 ± 0,12dy	31,08 ± 0,16dxz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

*Deney 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrar 10 bireyden toplanarak oluşturulan hemolenf kullanılarak yapılmıştır.

3.3.2. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

G. mellonella pup hemolenfinde analiz edilen KAT enzim aktivitesinde dozlar ve saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler olduğu gözlenmiştir (F (1.saat)=1248,792, F (2.saat)= 817,324, F (4.saat)= 682,656; df=3,20; p=0,000; Tablo 3.11). Kontrol grubunda 1. saatte $17,56 \pm 0,17$ U/mg protein olarak belirlenen KAT aktivitesinin en yüksek doz olan 0,5 µg’lık venom dozunda azalarak $3,08 \pm 0,17$ U/dak/mg protein olduğu belirlendi. En yüksek venom dozunun 4 saatlik uygulamasına

bakıldığında ise katalaz enzim aktivitesindeki azalmanın devam ettiği ancak 1. saatlik uygulamaya göre katalaz aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edildi.

Tablo 3. 11. *P. turionellae* venomunun *G. mellonella*'nın pupal hemolenfindeki KAT aktivitesine etkileri

KATALAZ U/dak/mg protein ORT $\pm$ SH*			
Venom doz (μ g/2 μ l) **	1. Saat	2. Saat	4. Saat
Kontrol (ISB)	17,56 $\pm$ 0,17 ax	19,39 $\pm$ 0,19 ay	24,40 $\pm$ 0,17 az
0,125	10,88 $\pm$ 0,17 bx	13,29 $\pm$ 0,22 by	17,83 $\pm$ 0,41 bz
0,25	5,31 $\pm$ 0,22 cx	8,21 $\pm$ 0,23 cy	11,31 $\pm$ 0,24 cz
0,5	3,08 $\pm$ 0,17 dx	5,21 $\pm$ 0,23 dy	8,27 $\pm$ 0,21 dz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). Analizler 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrarda 10 adet pup kullanıldı.

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

3.3.3. Glutatyon-S-Transferaz Aktivitesi

Venom uygulamasına bağlı olarak konak böcek *G. mellonella* pupal hemolenfinde GST enzim aktivitesinin hem doza bağlı hem de venom uygulama süresine bağlı olarak anlamlı değişiklikler gösterdiği belirlendi ($F(1.\text{saat}) = 290,965$, $F(2.\text{saat}) = 372,641$, $F(4.\text{saat}) = 73,640$; $df=3,20$; $p=0,000$; Tablo 3.12).

Kontrol grubunda 1. saatte $10,65 \pm 0,27$ U/mg protein olarak belirlenen GST enzim aktivitesinin en yüksek doz olan $0,5 \mu\text{g}$ 'lık venom dozunda azalarak $3,93 \pm 0,08$ U/mg protein olduğu belirlendi. En yüksek venom dozunun 4 saatlik uygulamasına bakıldığında katalaz enzim aktivitesindeki azalmanın devam ettiği ancak 1. saatlik uygulamaya göre daha yüksek olduğu tespit edildi.

Tablo 3. 12. *P. turionellae* venomunun *G. mellonella*'nın pupal hemolenfindeki GST aktivitesine etkileri

GST nmol/dak/mg protein ORT $\pm$ SH*			
Venom doz (μ g/2 μ l)	1. Saat	2. Saat	4. Saat
Kontrol (ISB)	10,65 $\pm$ 0,27 ax	11,98 $\pm$ 0,11 ay	14,70 $\pm$ 0,67 ay
0,125	6,58 $\pm$ 0,11 bx	8,44 $\pm$ 0,20 by	10,45 $\pm$ 0,18 bz
0,25	5,03 $\pm$ 0,17 cx	6,87 $\pm$ 0,15 cy	9,06 $\pm$ 0,23 cz
0,5	3,93 $\pm$ 0,08 dx	5,55 $\pm$ 0,09 dxy	7,09 $\pm$ 0,17 dy

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). Analizler 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrarda 10 adet pup kullanıldı.

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

3.3.4. Süperoksitdismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Venom uygulanan ve uygulanmayan *G. mellonella* pupal hemolenfinde SOD enzim aktivitesinde venom uygulama dozuna ve süresine bağlı olarak anlamlı farklılıklar belirlendi (F(1.saat)= 166,851 F(2.saat)= 175,834 F(4.saat) = 244,683; df=3, 20; $p=0,000$, Tablo 3.13). SOD enzim aktivitesinin en yüksek dozda venom uygulamasına 1 saat maruz kalan puplarda kontrole göre %54 oranında azaldığı tespit edildi. 2. saatte ise bu azalma oranının yaklaşık olarak %59 oranında olduğu, 4. saatin sonunda ise bu oranın %45 oranına kadar düştüğü saptandı.

Tablo 3. 13. *P. turionellae* venomunun *G. mellonella*'nın pupal hemolenfindeki SOD aktivitesine etkileri

SOD nmol/mg protein ORT $\pm$ SH*			
Venom doz (μ g/2 μ l)	1. Saat	2. Saat	4. Saat
Kontrol (ISB)	2,74 $\pm$ 0,08 ax	2,40 $\pm$ 0,03 ay	2,92 $\pm$ 0,047az
0,125	2,04 $\pm$ 0,04 bx	1,63 $\pm$ 0,04 by	2,29 $\pm$ 0,03 bz
0,25	1,45 $\pm$ 0,02 cx	1,44 $\pm$ 0,04 cy	1,93 $\pm$ 0,05 cz
0,5	1,49 $\pm$ 0,02 cx	1,43 $\pm$ 0,03 cxy	1,34 $\pm$ 0,04 dy

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). Analizler 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrarda 10 adet pup kullanıldı.

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

3.3.5. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi

Venom uygulamasına bağı olarak *G. mellonella* pupal hemolenfinde görülen, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarının uygulanan bütün dozlara ve saatlere bağı olarak farklı seviyelerde olduğı belirlendi (F(1.saat)= 247,765 F(2.saat)= 158,946 F(4.saat) = 469,914 df=3,20 p=0,000). 1. saatte kontrol grubunda $44,06 \pm 0,66$ U/ml olarak belirlenen MDA miktarının kontrole kıyasla venom uygulamasına bağı olarak azaldığı belirlendi. Bu azalma en yüksek venom dozunda yaklaşık %46 oranlarında tespit edildi (Tablo 3.14). Venom uygulmasına maruz kalan puplardaki MDA miktarı diğerk inkübasyon sürelerinde de benzer olarak azalmıştır.

Tablo 3. 14. *P. turionellae* venomunun *G. mellonella*’nın pupal hemolenfinde MDA aktivitesine etkileri

MDA U/ml ORT $\pm$ SH*			
Venom doz (μ g/2 μ l)	1. Saat	2. Saat	4. Saat
Kontrol (ISB)	$44,06 \pm 0,66$ ax	$40,20 \pm 1,16$ ay	$36,05 \pm 0,44$ az
0,125	$31,24 \pm 0,65$ bx	$29,32 \pm 0,32$ by	$24,96 \pm 0,36$ bz
0,25	$26,76 \pm 0,81$ cx	$24,26 \pm 0,54$ cy	$19,51 \pm 0,38$ cz
0,5	$20,15 \pm 0,37$ dx	$18,74 \pm 0,60$ dy	$15,60 \pm 0,45$ dz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). Analizler 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrarda 10 adet pup kullanıldı.

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

3.4. Parazitlemenin Konak Pup Hemolenf Protein Miktarı ve Enzim Aktivitelerine Etkisi

Parazitlemenin konak böcek hemolenfinde etkisinin belirlenmesi amacıyla, parazitlenme için dişilere maruz kalan puplardan 1., 2. ve 24. saatlerin sonunda toplanan hemolenf örnekleri analiz edildi. Elde edilen verilerde kontrol ile parazitlenmiş konak pup hemolenf protein miktarı arasında anlamlı bir fark bulundu (F(1.saat)= 787,070 F(2.saat)= 500,797 F(4.saat) = 301,413; df=1,10, p=0,000). Parazitlenmiş pupal hemolenf örneklerinde ölçülen protein miktarının parazitlenme süresine bağı olarak kontrollere kıyasla giderek arttığı belirlendi (Tablo 3.15).

Tablo 3. 15. Parazitlemenin *G. mellonella*'nın pupal hemolenfindeki Protein miktarına etkileri

Protein µg/µl ORT ± SH*			
Uygulama	1. Saat	2. Saat	4. Saat
Kontrol	24,75 ± 0,35 ax	24,29 ± 0,26 ay	24,94 ± 0,31az
Parazitleme	46,99 ± 0,71 bx	50,06 ± 1,12 by	61,13 ± 2,06 bz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-b) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). Analizler 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrarda 10 adet pup kullanıldı.

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

Parazitlemenin KAT aktivitesine etkisine bakıldığında anlamlı değişimler olduğu saptandı (F(1.saat)= 253,628 F(2.saat)= 2562,129 F(4.saat) = 7480,426; df=1, 10; $p=0,000$). Kontrol grubuna kıyasla parazitlemenin 1. saatte enzim aktivitesini oranında %50'lik bir azalma gözlemlendi. 2. saatte bu azalma %28 oranında seyrederken 4. saatin sonunda %10 oranına kadar azalmıştır. (Tablo 3.16).

Tablo 3. 16. Parazitlemenin *G. mellonella*'nın pupal hemolenfindeki Katalaz aktivitesine etkileri

KATALAZ U/dak/mg/protein ORT ± SH*			
Uygulama	1. Saat	2. Saat	4. Saat
Kontrol	13,26 ± 0,13 ax	14,64 ± 0,14 ay	18,42 ± 0,12 az
Parazitleme	6,49 ± 0,41 bx	4,09 ± 0,15 by	1,94 ± 0,14 bz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-b) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). Analizler 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrarda 10 adet pup kullanıldı.

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

Konağın pupal hemolenfindeki GST aktivitesi ölçümü sonuçları, saatlere göre parazitleme ve kontrol gurubunun arasında anlamlı değişimler olduğunu göstermiştir (F(1.saat)= 101,818 F(2.saat)= 100,846 F(4.saat) = 13,857; df=1, 10; $p =0,000$, Tablo 3.17). Parazetlenmiş puplarda ölçülen GST aktivitesi 1. ve 2. saatlerde kendi kontrol grupları ile kıyaslandığında artış gösterdi, ancak 4.saatin sonunda parazetlenmiş pupal GST aktivitesi hem kontrole göre hemde diğer saatlere göre önemli oranda azaldı.

Tablo 3. 17. Parazitlemenin *G. mellonella*'nın pupal hemolenfindeki MDA aktivitesine etkileri

GST nmol/dak/mg protein			
ORT± SH*			
Uygulama	1.Saat	2.Saat	4.Saat
Kontrol	2,13 ± 0,05 ax	2,40 ± 0,02 ay	2,94 ± 0,14 az
Parazitleme	7,43 ± 0,52 bx	4,61 ± 0,22 by	2,39 ± 0,06 bz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-b) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). Analizler 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrarda 10 adet pup kullanıldı.

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

Parazitlemenin SOD enzim aktivitesine bakıldığında saatlere göre anlamlı değişimler saptandı (F(1.saat)= 780,614 F(2.saat)= 2863,368 F(4.saat) = 2906,056; df=1,10; p=0,000). Kontrol grubuna kıyasla SOD aktivitesi parazitlemenin 1.saatinde %20 oranında azaldığı, 2. saatte bu azalmanın %18 oranında olduğu, 4. saatin sonunda ise bu oranın %10 oranına kadar düştüğü belirlendi (Tablo 3.18).

Tablo 3. 18. Parazitlemenin *G. mellonella*'nın pupal hemolenfindeki SOD aktivitesine etkileri

SOD nmol/mg protein			
ORT± SH*			
Uygulama	1. Saat	2. Saat	4. Saat
Kontrol	2,74 ± 0,08 ax	2,81 ± 0,03 ay	2,92 ± 0,05 az
Parazitleme	0,57 ± 0,01 bx	0,53 ± 0,01 by	0,35 ± 0,01 bz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-b) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). Analizler 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrarda 10 adet pup kullanıldı.

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

Parazitlemenin konak pupal hemolenfindeki MDA miktarında saatlere göre anlamlı farklılıklara neden olduğu tespit edildi (F(1.saat)= 703,686 F(2.saat)= 636,308 F(4.saat)= 4130,761; df=1,10; p=0,000). 1. saatte parazitlemenin kontrol grubuna

kıyasla %45 oranında azaldığı 2.saatte bu değişim oranının %25 civarında seyrederken 4.saatın sonunda bu oranın %15'e kadar düştüğü belirlendi (Tablo 3.19).

Tablo 3. 19. Parazitlemenin *G. mellonella*'nın pupal hemolenfinde MDA miktarına etkileri

MDA U/ml			
ORT ± SH*			
Uygulama	1. Saat	2. Saat	4. Saat
Kontrol	44,06 ± 0,66 ax	40,20 ± 1,16 ax	36,05 ± 0,44 az
Parazitleme	19,87 ± 0,63 by	10,24 ± 0,26 by	5,38 ± 0,17cz

*Aynı sütunda farklı harfle (a-b) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). Analizler 6 tekrarlı olmak üzere her bir tekrarda 10 adet pup kullanıldı.

**Aynı satırda farklı harfle (x-z) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Parazitoit yaban arısı türlerinin venom bezlerinde üretilen peptid ve proteinler, seviye ve çeşitlilik açısından dikkat çekici özellikler taşımaktadır. Bu proteinlerin çoğu, konağının immün yanıt oluşumunu durdurma ve gelişimini engelleme/inhibe etme gibi, konak vücudunda çeşitli fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Böylece kendi yavrularının konaktaki gelişimini kolaylaştırmak için gerekli evrimsel fizyolojik adaptasyonları kazanmışlardır. Parazitoit türlerin venom keselerinde bulunan bu toksinler zararlı böceklerle kontrol stratejileri tasarlarken çevre dostu bileşiklerin üretiminde değerli olabileceği gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde farmasötik özellikleri bakımından da dikkat çekmektedir.

Son yıllarda çeşitli hayvanların venomları ile yapılan çalışmalarda, venom veya türevinin *in vitro* olarak birçok farklı kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olduğu belirlenmiştir (Shanbhag, 2015; Sarfo-Poku vd., 2016; Rady vd., 2017; Sisakht vd., 2017; Khamis vd., 2018; Liana vd., 2018). Sarfo-Poku vd., (2016) tarafından akrep venomunun, meme kanserinin tedavisinde yararlı olabilecek bazı antibakteriyel özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir. Son zamanlarda örümcek türlerinden biri olan *Haplopelma hainanum* venomu ile yapılan bir çalışmada, venomun kaspaz aktivasyonu ile apoptozisi indüklediği ve hepatik kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı bulunmuştur (Liana vd., 2018). Bir başka çalışmada ise yılan venomunun düşük dozlarda uygulandığında umut verici bir anti-malign özellik gösterdiği bildirilmiştir (Kerkkampa vd., 2018). Ayrıca, Khamis vd., (2018) MCF7 ve T47D meme kanseri hücre hatlarında arı venomunu *in vitro* test ederek, venomun sitotoksik etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Özellikle, Rady vd., (2017) arı venomundan izole edilen konjugatların ve melittinin kanser tedavisi için potansiyel oluşturduğunu öne sürmüşlerdir. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışma da ise, *P. turionellae* venomu ile benzer özellikler gösteren bal arısı venomunun, 24 ve 48 saatlik uygulanmasına bağlı olarak insan glioblastoma hücre canlılığının doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Sisakht vd., 2017). Daha önce yapılan bu çalışmalara benzer olarak, bu çalışmada da, endoparazitoit *P. turionellae* venomunun, kısa süreli maruz kalma sürelerinde bile sıçan glioblastoma hücreleri üzerinde, doza bağlı olarak, sitotoksik etki ettiği belirlendi.

Aynı zamanda, bu çalışmada elde edilen veriler, endoparazitoit venomunun glioma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin inkübasyon süresi arttıkça değişmediğini göstermektedir. Bu durum daha önce venomlar üzerinde yapılan çalışmalarda da bahsedildiği gibi toksin içeriği yüksek olan venomun etkinliğinin 24 saat içerisinde azaldığına işaret etmektedir. Çünkü uygulamadan 24 saat sonra venomun en yüksek dozunda bile hücre proliferasyonunda değişiklik saptanmadı. Bu nedenle gelecekte venom ilişkili tasarlanacak farmakolojik ajanların diagnostik özelliklerinin belirlenmesinde etkinlik süresinin mutlaka belirlenmesi gerekmektedir. Aynı zamanda venom etki süresinin kısıtlı olması, günümüzde kullanılan kimyasal içerikli kemoteropatik ilaçlara göre sağlıklı hücrelerde görülen toksisiteninde daha az olmasını sağlayabilir.

P. turionellae venomu ile yapılan bir çalışmada, venomun 20 ila 106 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip, melittin, noradrenalin, serotonin, peptit I, peptit II, fosfolipaz B, histamin ve apamin gibi biyomoleküller belirlenmiştir (Ergin vd., 2006). Ergin vd., (2006) *P. turionellae* venomunun, lahana mühendisi tırtılı *T. ni* embriyo hücreleri (BTI-TN-5B1-4) ve sarıhumma sivrisineği *A. aegypti* larvalarından kültüre edilmiş böcek hücreleri (Aag-2) üzerinde morfolojik değişimlere neden olduğunu saptamışlardır. Hücredeki bu morfolojik değişiklikler venom içeriğinde bulunan melittin ile ilişkili olabilir. Çünkü, venom bileşiğindeki diğer nörotoksik aktif peptidler ve proteinlerin aksine, melittin, hücre zarında spesifik bir reseptöre sahip değildir ve bu nedenle hücre zarı ile doğrudan etkileşime girmektedir (Terwilliger vd 1982; Gerristen, 2001). Bu nedenle fosfolipaz A₂'yi aktive ederek sitotoksik etki gösteren melittin, arı venomunun kanser tedavisinde önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Son vd., 2007). Bu nedenler ve çalışmamızda belirlenen bulgular endoparazitoid venomunun, sıçan glioma hücre canlılığı üzerindeki inhibitör etkisinin melittin ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. Ek olarak, *P. turionellae* venomunda parolitik bir faktör olarak da bulunan apamin (Ergin vd., 2006), kan-beyin bariyerlerinden geçerek (Gottlieb, 1988) memelilerin merkezi ve çevresel sinir sisteminde nöradrenerjik ve GABA (gama-aminobütrik asit)'erjik yollarla postsinaptik hücrelerde Ca²⁺ ile aktif hale geçen K⁺ kanallarını bloke etmektedir (Piek, 1972, Endstrom, 1992, Ikonen ve Riekkinen, 1999). Düşük dozlarda apaminin (0,1 µM) dışarıdan uygulanmasıyla gerçekleştirilen voltaj ve akım prob deneylerinde, kültüre edilmiş nöroblastoma ve sıçan

kas hücrelerinin, Ca^{2+} bağımlı yavaş K^+ kanallarında iletkenlik blokajını sağlayarak uzun süreli hiperpolarizasyona neden olduğu daha önce belirlenmiştir (Banks vd., 1979). Apaminin bu yapısal ve farmakolojik özellikleri nedeniyle *P. turionellae* venomunun glioblastoma hücrelerindeki sitotoksik etkisinin, venomda varlığı belirlenmiş olan melittin ve apamin ile ilişkili olabileceği kanısındayız.

Sonuç olarak, glioblastoma hücre proliferasyonu ve hücre ölümünün üzerinde her bir venom bileşeninin hangi mekanizmalarla etki gösterdiğini belirlemek için daha fazla çalışma yapmak gerektiğini önermekteyiz. Çalışmanın bu bölümü göstermiştir ki, *P. turionellae* venomu çeşitli kanser hastalıklarının tedavisi için geliştirilecek yeni farmakolojik ajanlar için bir potansiyele sahiptir.

Endoparazitoit ve konak arasındaki ilişkide konağın immün savunma sistemi, önemli bir rol üstlenmektedir. Parazitoit türler yavru gelişimi için uygun ortam sağlamak amacıyla konağın hormonal ve immün sistemini, gelişimini ve metabolik faaliyetlerini düzenleyebilecek çeşitli mekanizmalara sahiptirler (Beckage ve Gelman, 2004). Konak regülasyonu olarak adlandırılan bu mekanizmalar içinde (Vinson ve Iwantsch, 1980), önemli bir basamak olan konak bağışıklık sisteminden kaçınma; immünolojik olarak tanınmayı engelleme veya konağın hemositik savunma reaksiyonlarını baskılama şeklinde ortaya çıkmaktadır (Lavine ve Beckage, 1995; Hoffmann, 2003; Kanost vd., 2004; Zhang, 2006; Strand, 2006). Parazitoitdin etki edemediği konaklar çoğu zaman, parazitoitin üreme amacıyla yumurta ile birlikte konağa verdiği çeşitli etmenleri, ürettikleri sitolitik proteinler, hemolenfin pıhtılaşması, melanizasyon, fagositoz, nodülasyon ve enkapsülasyon gibi çeşitli yollarla ortadan kaldırmaktadırlar. Bu nedenle evrimsel süreçte parazitoitler konak immün yanıtlarının üstesinden gelmek için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Bazı parazitoitler pasif olarak, hemositleri barındıramayacak yerlerde veya bir bağışıklık tepkisine yol açmayan yüzey özelliklerine sahip olarak gelişerek ortadan kaldırılmayı önlemişlerdir. Diğer türler ise, konağa spesifik olarak faktörlerini yumurtlamada enjekte ederek konak bağışıklık sistemini aktif olarak bozmaktadırlar. Özellikle, birçok parazitoit taksonunda simbiyotik olarak yaşayan polidnavirüsler, hemositleri öldürerek veya yabancı yüzeylere yapışma yeteneklerini değiştirerek enkapsülasyon oluşumunu bozmaktadırlar.

Polidnavirüs bulundurmayan, sadece venomu ile konak bağışıklık sistemi üzerinde kontrol sağlayan *P. turionellae* türü ise, geniş bir konak yelpazesine sahiptir

(Kansu ve Ugur, 1984). *P. turionellae* dişilerinin sahip olduğu venom içeriğinin konak *G. mellonella*'nın farklı evreleri üzerinde toksik ve felç edici etkilere neden olduğu bilinmektedir (Ortel ve Vogel, 1989). Bu çalışmada uygulanan venom dozları kese eş değer venom (KEZ) olarak daha önce belirlenen içerik yerine, dişilere ait keselerden izole edilerek elde edilen venomun protein miktarına bağlı olarak belirlenmiştir. 15 günlük 10 adet dişiden elde edilen venom karışımının konak pupları üzerindeki lethal dozu (LD_{99}) 1,17 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ olarak, ortalama lethal doz (LD_{50}) ise 0,44 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca uygulanan venom lethal dozlarına maruz kalınan süre arttıkça konak puplarının MUC oranlarında giderek azaldı ve 4. saatin sonunda yüksek dozlarda erginleşme gerçekleşmedi. Bu sonuçlar konak böcekte ortaya çıkan venom toksisitesinin hem zamana hem de doza bağlı olarak önemli oranda arttığını göstermektedir. Elde ettiğimiz verilerin, parazitoit venomunun konak böcekteki sublethal etkilerinin belirlenmesi için yapılacak çalışmalarda kullanılacak olan dozların ve uygulama sürelerinin belirlenmesi açısından önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.

Daha önce yapılan çalışmalarda Hymenopter parazitoitlerinin, konaklarının fizyolojik faaliyetleri üzerine etkili oldukları hemolenf kompozisyonlarında değişiklik meydana getirdiği belirlenmiştir. Bir çalışmada, *Glyptapanteles liparidis* tarafından parazitlenen *Lymantria dispar* larvalarının hemolenfinde parazitlemenin total lipit ve total protein oranlarında azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Bischof ve Ortel, 1996). Yakın zamanda ise, parazitoit koinobiont *Bracon nigricans* venomunun konağı *Spodoptera littoralis* hemolenfinde protein ve karbonhidrat miktarını arttırdığı tespit edilmiştir (Becchimanzi vd., 2017). Bu çalışmada ise *P. turionellae* türünden elde edilen venom dozlarındaki artışın, konak hemolenfindeki total protein miktarının artmasına neden olduğu belirlendi. Doza bağlı bu artış venomun proteince zengin bir bileşik olması ve doğrudan konağa enjekte edilmesinden kaynaklanmış olabileceğini göstermektedir. Venom uygulaması üzerinden belirli bir süre geçtiğinde (1., 2. ve 4. saat) ise konak hemolenfindeki protein miktarının düştüğü tespit edildi. Çalışmamıza benzer olarak Kaleli, (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, endoparazitod *P. turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nin konak *G. mellonella* puplarının hemolenf protein bileşimi üzerinde parazitlenmenin etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, parazitlenmiş konağın hemolenf protein seviyesi parazitlenmemişe göre saatlere bağlı şekilde azalmıştır. Bu durumun nedeni ise daha önce yapılan çalışmalarda

da belirtildiği gibi endoparazitoidin, yumurtalarını bırakırken konağının immün sistemini baskılayacak çeşitli proteazlar enjekte etmesi olabilir.

Konak regülasyonunun sağlanmasında önemli bir diğer mekanizma ise konağın antioksidan savunma sisteminin baskılanması olabilir. Bilindiği üzere endojen ve ekzojen kökenli stres faktörleri canlıların biyolojik sistemlerinde sürekli olarak serbest oksit radikallerin (SOR) ve diğer oksijen kökenli türlerin üretilmesine neden olmaktadır. Bu hücreler ise bu stres faktörlerine maruz kalmayı sınırlamak için güçlü, kompleks, moleküler ve enzimatik özellikler taşıyan antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bu SOR'ler; katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon S transferaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler ve A, E ve C vitaminleri, glutatyon, ubikinon, lipoik asit ve flavonoidler dâhil olmak üzere enzimatik özellik göstermeyen antioksidan sistem tarafından etkisiz hale getirilmektedir (Urso ve Clarkson, 2003; Greathouse vd., 2005; Özkaya, 2007). Diğer tüm canlılarda olduğu gibi böceklerde de reaktif oksijen türevlerinin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması için özelleşmiş, küçük moleküler ağırlığa sahip bileşikler ve enzimler bulunmaktadır (Grubor-Lajsic vd., 1997). Bu sistem özellikle herbivor böceklerde bitkisel allelokimyasalların detoksifikasyonu için yoğunlukla kullanılmaktadır (Felton vd., 1989; Felton ve Duffey, 1991; Thiboldeaux vd., 1998; Kaur vd., 2014). *G. mellonella* konak türünde bu allelokimyasallara enzim aktivitelerini yükselterek yanıt oluşturduğu bilinmektedir (Büyükgüzel, 2006; 2009). Ancak bu çalışmada uygulanan *P. turionella* venomu konak pupundaki hemolenfe ait antioksidan enzim aktivitelerinin azalmasına neden olmuştur. Bu durum ise parazitoitin konak regülasyonunda, konağın antioksidan savunmasını da baskılandığı hipotezimizi doğrulamaktadır.

SOD antioksidan faz I enzimlerden birisi olup, reaktif oksijen türlerine karşı geliştirilen antioksidan savunmada önemli rol oynamaktadır (Zenkov vd., 2001; Gaeta vd., 2002). Normal koşullarda SOD, hücrenin oksidatif strese girmesini engelleyerek aerobik reaksiyonlarda ortaya çıkan süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşmesini katalizlemektedir (Sun vd., 1988; Sankarapandi ve Zweier, 1999). Bununla birlikte, böceklerin çevresel ajanlar ve bitkisel metabolitlere maruz kaldığında SOD enzim aktivitesinde artışlar olduğu bilinmektedir (Krishnan ve Kodrik, 2006; Altuntaş, 2015a; 2015b). SOD enzim aktivitesi sonucunda ikinci kademedeki görev yapan KAT enzimi (Gaeta vd., 2002) ise, hidrojen peroksit radikalının

artış gösterdiği durumlarda aktivite gösterir ve hücrede bulunan hidrojen peroksit moleküllerinin detoksifikasyonundan sorumludur (Tekcan, 2009). Çeşitli bitkisel ürünlerin veya çevresel kimyasalların böceklerde oksidatif strese neden olduğu ve buna bağlı olarak da canlıda antioksidan savunma mekanizmasının daha yüksek oranlarda çalışarak dirençliliğin sağlandığı bilinmektedir (Krishnan ve Kodrik, 2006; Aslantürk vd., 2011; Büyükgüzel vd., 2013; Altuntaş, 2015a; 2015b). Görüldüğü üzere böcekler üzerinde yapılan çalışmalar genellikle pestisit etkisinin mekanizmasını açıklamaya yöneliktir. Venom çeşitlerinin böceklerin antioksidan sistemi üzerine etkilerini belirlemeye yönelik çalışmalara ise literatürde rastlanılmamıştır. Ancak hayvansal kökenli ham venomun veya bileşenlerinin memeli deney hayvanları ya da hücre hatları üzerindeki etkilerini belirleyen çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmalardan birisinde akrep (*Leiurus quinquestriatus*) ham venomunun farelerin karaciğer dokularında KAT, SOD ve Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü saptanmıştır (Salman ve Hammad, 2017). Başka bir çalışmada, *Odontobuthus doriae* türüne ait akrep venomu insan meme kanseri MCF-7 hücre hattına uygulandığında hücrelerdeki GSH ve katalaz aktivitesinin kontrole göre güçlü bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (Zargan vd., 2011). Bir başka akrep türü olan *Androctonus australis hector* (Aah) venomunun ise, fare karaciğer ve böbrek dokularındaki katalaz ve glutasyon redüktaz aktivitelerinde azalmaya neden olduğu daha önce yapılan bir çalışmada tespit edilmiştir (Saidoune-Malek vd., 2018). Daha önce yapılan bu çalışmalara benzer olarak, *P. turionellae* venomuna maruz kalan konak puplarının hemolenfinde hem SOD hem de KAT aktivitelerinin azaldığı çalışmamızda belirlenmiştir. SOD ve KAT aktivitelerinde görülen bu inhibisyon durumu, daha önceki yapılan çalışmalarda da (Er vd., 2010; Er vd., 2011a; Uçkan vd., 2010) bildirildiği gibi *P. turionella* venomunun hedef konak *G. mellonella* hemositlerinin hücre canlılığını azaltması ve venom içeriğinde bulunan aktif moleküllerin hemolenfte bulunan serbest enzimlerin çalışmasını baskılamasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, bu aktivite düşüşleri *G. mellonella* puplarında düşük venom dozlarında bile fizyolojik bir direncin oluşturulamadığını göstermektedir.

GST, faz II detoksifikasyon enzimlerinden biri olan ve böceklerde de stres koşulları altında hücresel detoksifikasyonun sağlanmasında rol oynayan multifonksiyonel bir enzimdir (Hyrsl vd., 2007; Oruç, 2011; Altuntaş, 2015a). Daha

önce *G. mellonella* ve başka türler üzerinde yapılan çalışmalarda, eksojen kaynaklı kimyasallara maruziyetin canlıdaki GST aktivitesinde artışa ya da azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Yu ve Abo-Elghar, 2000; Büyükgüzel vd., 2013; Altuntaş, 2015a, 2015b). Ancak bu enzimle ve venom uygulamasıyla ilişkili literatürde başka bir çalışma tespit edilememiştir. Bu çalışmada venom uygulamasına bağlı olarak pupların hemolenfinde GST aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Bu azalma ise venom içeriğinde konak *G. mellonella* puplarının primer detoksifikasyon metabolizmalarında rol oynayan GST enzimini inhibe eden proteazların varlığına işaret etmektedir. MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve çeşitli ksenobiyotiklere maruz kalan böceklerde MDA miktarının arttığı bilinmektedir (İçen vd., 2005; Büyükgüzel, 2006; 2009; Yu vd., 2011). Bu artış ise hücre membranlarının stabilitesinin ve yapısal bütünlüğünün bozulması gibi önemli toksik etkilere neden olmaktadır (Tülüce, 2005). Daha önce yapılan bir çalışmada bir akrep türü olan *A. australis hector* (Aah) venomunun farklı dozlarının, fare karaciğer ve böbrek dokularındaki lipid peroksidasyonunun azalmasına neden olarak oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiştir (Lamraoui vd., 2015). Başka bir çalışmada ise kanser hücreleri üzerinde arı venomunun çeşitli etkileri araştırılmış venom uygulanan hücrelerde kontrole göre lipid peroksidasyonunun düştüğü bildirilmiştir (Sobral vd., 2016). Memelilerle yapılan çalışmalara benzer olarak, bu çalışmada da model organizma ve konak böcek olan *G. mellonella* puplarının hemolenfinde belirlenen MDA miktarının venom uygulamasına bağlı önemli oranda azaldığı tespit edildi. Konaktaki lipid peroksidasyonunun venom uygulama dozuna ve süresine bağlı olarak azalması, parazitoit oğul döllerinin sağlıklı bir ortamda gelişmesi için oksidatif stresin önlenmesi yönünde ortaya çıkan bir regülasyon mekanizması ile ilişkili olabilir.

P. turionellae'nın sublethal venom dozlarının konak böceğin pupal hemolenfindeki antioksidan savunma sistemini baskıladığı ve lipid preoksidasyonunu azaltarak oksidatif stresi engellediğini belirlediğimiz bu çalışma sonuçları ile daha önce memeliler üzerinde yapılan çalışmaların benzerlik göstermesi ise önemli bir bulgudur. Bu sonuçlar parazitoit venomlarının diğer arı türleri ve akrep venomları ile benzer etki mekanizmasına sahip olduğunu ve *G. mellonella* türünün venom etki mekanizmalarının araştırılmasında model organizma olarak memeli hayvanlar yerine kullanılabileceğini göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında hedeflenen bir diğer amaç ise endoparazitoit venomunun immün sistemi baskılanmasının yanısıra böcek hemositlerinde sitogenetik hasara neden olup olmadığını belirlemektir. Daha önce böceklerle ilişkili yapılan çalışmalarda, hemositlerin sitogenetik hasarı gösterebilmek için oldukça elverişli bilgiler sunduğu belirlenmiştir. Özellikle hemositlerde gözlemlenen yapısal anormalliklerden MN oluşumu sıklıkla kullanılmıştır (Yeh vd., 2005; Wessel vd., 2007). Aynı zamanda MN analizinin, genotoksik etkileri değerlendirmek için uygun ve hızlı bir teknik olduğu bilinmektedir (Siu vd., 2004a; Bolognesi vd., 2011; Kurt ve Kayış, 2015). Tosun vd., (2001)'leri hemositlerdeki kromozomal delesyon ve anormalliklerin, mutasyonlara ve mikronukleus oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle toksik, mutajenik ve kanserojen bileşiklerin mikronukleus sayısını arttırması önemli bir göstergedir (Rencuzoğulları ve Topaktaş, 2000; Şekeroğlu-Atlı ve Şekeroğlu, 2011). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da çeşitli ksenobiyotiklerin canlı organizmalarda MN oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Rencuzoğulları ve Topaktaş, 2000; Çelik vd., 2005; Uçkan ve Sak, 2010; Kurt ve Kayış, 2015). Bu nedenle, kimyasal maruziyetine bağlı ortaya çıkan MN indeksindeki değişimler, kromozom düzensizliklerini ve somatik hücrelerdeki genomik hasarı indirekt olarak ile değerlendirilebilir hale getirmektedir. Yapılan bir çalışmada *Bothrops pauloensis* yılan türünün venomunda bulunan Lys-49 fosfolipaz A₂ (PLA₂) homologu BnSP-6'nın, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde MN sayısını arttırarak genotoksisiteye neden olduğu belirlenmiştir (Silva vd., 2018). Benzer olarak bu çalışmada ise, konağın pupal hemositlerinde tespit edilen MN frekansının uygulanan *P. turionellae* venom dozları ve maruziyet süresi arttıkça önemli oranda arttığı belirlenmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar endoparazitoit venomunun konak hemositleri üzerinde sitogenetik hasara neden olduğunu göstermekte ve genotoksik bir ajan olarak zararlı böcek kontrol programlarında kullanılabilir olduğuna işaret etmektedir.

Moleküler epidemiyoloji, ekotoksikoloji, biyoizleme ve genotoksisite çalışmalarında canlı DNA'sındaki hasarın belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan standart metodlardan birisi Tek hücre jel elektroforesi (COMET) analizidir (Packiam vd., 2015). Bununla birlikte çeşitli ajanların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde Mikronukleus testi (MN) ve COMET analizinin birlikte kullanılması gittikçe popüler

hale gelmektedir (Andrade vd., 2004; Ateeq vd., 2005; Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2003a, 2003b, 2005). Literatürdeki çeşitli araştırmalarda bu yöntemlerin birlikte kullanılmasına yönelik birçok çalışma yer almaktadır. Daha önce yapılan bu çalışmalarda, çeşitli genotoksik ajanların hayvansal organizmalarda MN frekansında ve önemli COMET indikatörleri olan kuyruk uzunluğu, kuyruk yüzdesi, Olive kuyruk momentleri gibi parametrelerde artışlara neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum ise genotoksik ajanların DNA hasarında artışa neden olarak canlının genomu üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu yönünde yorumlanmıştır (Siu vd., 2004a; Woźnicki vd., 2004; Çavaş ve Könen, 2007; Yılayaz, 2008; Muranlı-Gökalp ve Güner, 2011; Muangphra ve Gooneratne, 2011; Eskandari vd., 2012). Yapılan bu çalışmalar genotoksik etkinin belirlenmesinde COMET analizi ve mikronukleus testinin birlikte değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir. Bu nedenle bu çalışmada venomun konak hemositleri üzerindeki genotoksitesinin belirlenebilmesi için COMET ve MN analizleri gerçekleştirilmiştir. Farklı dozlarda venoma maruz kalan *G. mellonella* puplarından elde edilen hemositlerdeki COMET bulgularının değerlendirilmesi için literatürde de sıklıkla kullanılan kuyruk boyu, kuyruk yoğunluğu (% DNA Tail, Tail Intensity) ve kuyruk momentleri (Tail Moment) parametreleri kullanıldı (Kumaravel ve Jha, 2006). Bununla birlikte kuyruk momentleri ile kuyruk göçü arasındaki paralel ilişki göz önüne alınarak kuyruk göçünde meydana gelen değişimler de analiz edildi. Yapılan literatür çalışmalarında parazitoit venomlarının böcekler veya memeli hayvanlar üzerinde genotoksik hasara neden olup olmadığını gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada ilk kez bir endoparazitoit venomunun konak böcek üzerindeki genotoksik etkileri belirlenmiştir. Ancak literatürde çeşitli hayvansal kaynaklı venom bileşenlerinin memeliler üzerinde genotoksik etkiye neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (Marcussi vd., 2011; Marcussi vd., 2012a; Marcussi vd., 2012b; Galvani vd., 2017; Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2008). Bir yılan türü olan çukur engerek *Crotalus durissus terrificus* venomundan izole edilen çeşitli toksinlerin (crotoxin, crotapotin ve CB PLA2) MN ve COMET analizi ile genotoksik etkisinin test edildiği çalışmada, 3 µg/ml'den daha yüksek venom dozlarına maruz kalan insan lenfositlerinde DNA hasarının arttığı bildirilmiştir (Marcussi vd., 2011). Bir diğer çalışmada ise, *Bothrops jararacussu*, *B. brazili* ve *B. atrox* venomlarından izole edilen BthTX-I, BthTX-II, BjussuMP-II ve BatxLAAO toksinlerin 5 mg/ml'den yüksek olan dozlarında insan lenfositlerinin DNA'sında kırılmaya neden olduğu gösterilmiştir.

Marcussi vd., (2012a, 2012b)'nin farklı yılan türleri ile yapılan çalışmalarında ise, *Bothrops jararaca* ve *Micrurus corallinus* venomlarının insan lenfositlerinde MN frekansını ve COMET parametrelerini arttırarak DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise, *Tityus serrulatus* akrep türünün venomuna maruz kalan farelerin korteks, striatum, hipokampus, karaciğer, akciğer, böbrek, kan ve kalp gibi organlarda tespit edilen genotoksisitenin oranlarının organdan organa farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Galvani vd., 2017). Hymenoptera takımında bulunan arı venomunun insan lenfositlerindeki genotoksik etkisini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada ise COMET analizi sonucunda, kontrol hücrelerine kıyasla arı venomu uygulanan lenfositlerin kuyruk boyunda ve kuyruk momentinde DNA hasarı belirlenmiştir (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2008). Bir yaban arısı türü olan *Polybia paulista* venomunun hepatosellüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücreleri üzerindeki uygulamalarında ise düşük venom dozlarının sitotoksositeye neden olmadığı, ancak doz yükseldikçe genotoksik etkilerinin olduğu comet analizi ile tespit edilmiştir (Hoshina vd., 2013). Çeşitli hayvansal venom izolatlarının memelilerde ve insan lenfositlerinde uygulanmasına bağlı görülen genotoksik etkilere benzer olarak, bu çalışmada da *P. turionellae* venom dozu ve uygulama süresi arttıkça konak puplarının hemositlerinde kontrol grubuna kıyasla tüm COMET parametrelerinde (kuyruk yoğunluğunda, kuyruk momentinde, kuyruk boyunda ve kuyruk göçünde) önemli artışlar belirlendi. Böylece elde ettiğimiz bulgular daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. Aynı zamanda sonuçlarımız hayvansal venom bileşenlerinin bir toksin kaynağı olarak hem memelilerde hem de böceklerde genotoksositeye neden olduğunu göstermektedir.

DNA hasarı, bir hücrede yüksek miktarda gerçekleştiğinde hücre kontrol noktalarından geçemez ve çeşitli yollarla apoptoza sürüklenir ya da değişikliğe uğramış bir genomla hayatta kalır. Tice vd., (2010) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada apoptotik ve nekrotik hücrelerin COMET analizinde ayırt edilebileceği ileri sürülmüştür. Araştırmacılara göre, apoptotik hücreler küçük baş ve büyük yelpaze benzeri kuyruklar bulundururken, nekrotik hücreler ise nispeten büyük baş ve değişken uzunluklardaki dar kuyruklar oluşturmaktadır (Tice vd., 2000). Ayrıca bazı çalışmalarda, apoptik hücrelerin sayısındaki artış ile mikronukleus testi ile tespit edilen kromozom hasarındaki artışın doğru orantılı olduğu vurgulanmıştır (Simkó vd., 1998;

Meintieres vd., 2001). Daha önce *P. turionella*'dan izole edilen venom kese eşdeğerlerinin konak *G. mellonella* puplarına enjekte edildiği çalışmalarda, venomun konak hemositlerinde hücre canlılığını ve mitotik aktiviteyi azaltarak enkapsülasyon davranışını engellediği ve konak hemositlerindeki apoptozu teşvik ettiği belirlenmiştir (Er vd., 2010; Er vd., 2011a; 2011b; Uçkan vd., 2010). Çalışmamızda ise yüksek venom dozlarında küçük baş ve büyük yelpaze benzeri kuyruklara sahip COMET'lerin varlığı ile MN frekansının yükselmesine ait bulgular, venomun konak hemositlerinde apoptotik mekanizma ile hücre ölümüne neden olduğunu destekler niteliktedir. Bu nedenle COMET ve MN analizlerinden elde edilen bulgularımız endoparazitoit *P. turionellae* venomunun konak hemositlerinde genomik hasara neden olarak apoptozu teşvik ettiğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında sunulan bulgular venomun, model böcek ve depo zararlısı olan konak *G. mellonella* üzerinde antioksidan savunma sistemini baskılayarak, genomik hasara neden olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra *P. turionellae* venomunun doğal hedefi olmayan glioblastoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin olduğu da çalışma kapsamında tespit edilmiştir. Böylece, *P. turionellae* venomu, konağın savunma sistemini güçlü bir şekilde baskılamasının yanı sıra günümüzde tedavisi oldukça zor olan bir kanser türü içinde büyük umutlar bulundurmaktadır. Aynı zamanda *G. mellonella* gibi önemli depo zararlılarının mücadelesi için gelecekte yapılacak olan entegre mücadelede çalışmalarında bir biyopestisit olarak venomun kullanılabileceğine ilişkin veriler çalışma sonuçlarımız ile güçlendirilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen bulgulardan teknolojik olarak yararlanılabilmesi için öncelikli olarak parazitiot *P. turionellae*'nın genomik çalışmaları tamamlanmalı ve venom içeriğinin, rekombinant gen teknolojisi ile uzun uğraşlara gerek kalmadan üretilmesi gerekmektedir. Bunun ardından türe ait venomun detaylı olarak saflaştırılması sağlanmalı ve içindeki peptid ve/veya proteinlerin fonksiyonları aydınlatılmalıdır. Ayrıca endoparazitoit venomunun farmostatik veya pestisit olarak kullanılabilmesi için aktivite temelli venom içerik çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Özellikle saflaştırılan venom preperatlarının böcek sindirim sisteminden zarar görmeden dolaşım sistemine aktarılmasını sağlayacak nanoteknolojik partiküllerin geliştirilmesini önermekteyiz. Böylece zararlı böcek ile mücadelede insanları minimum

düzeyde etkileyecek ve çevre kirliliğine neden olmayacak alternatif çözümler bulunarak, ülke ve dünya ekonomisine katkı sağlanabilir.



KAYNAKÇA

- Abt, M. and Rivers, D.B. (2007). Characterization of phenoloxidase activity in venom from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94, 108–118.
- Ahmad, S. (1992). Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemical Systematics and Ecology*, 20, 269-296.
- Ahmad, S., Pritsos, C.A., Bowen, S.M., Heisler, C.R., Blomquist, G.J., Pardini, R.S. (2005). Subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 7, 173-18.
- Ahmad, S., Zaman, K., MacGill, R.S., Batcabe, J.P., Pardini, R. (1995). Dichloro-induced oxidative stress in a model insect species, *Spodoptera eridania*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29, 442-448.
- Altuntaş, H. (2015a). Determination of gibberellic acid (GA3)-induced oxidative stress in a model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology (Physiology)*, 44 (1), 100-105.
- Altuntaş, H. (2015b). Effects of ethephon on the hemolymph metabolites of the greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Physica Polonica A*, 128, 182-183.
- Andrade, V.M., Freitas, T.R. and Silva, J. (2004). Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research*, 560, 57-67.
- Ardağ, A. (2008). Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Asgari, S. and Rivers, D.B. (2011). Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. *Annual Reviews of Entomology*, 56, 313-335.
- Aslantürk, A., Kalender, S., Uzunhisarcıklı, M., Kalender, Y. (2011). Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae. *Journal of the Entomological Research Society*, 13 (3), 27-38.
- Ateeq, B., Abul-Farah, M. and Ahmad, W. (2005). Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and

- butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 348-354.
- Augustyniak, M., Orzechowska, H., Kedzierski, A., Sawczyn, T., Dolezych, B. (2014). DNA damage in grasshoppers' larvae – Comet assay in environmental approach. *Chemosphere*, 96, 180-187.
- Banks, B.E., Brown, C., Burgess, G.M., Burnstock, G., Claret, M., Cocks, T.M. (1979). Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature*, 282 (5737), 415–417.
- Barbehenn, R.V., Bumgarner, S.L., Roosen, E.F., Martin, M.M. (2001). Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *Journal of Insect Physiology*, 47, 349-357.
- Baş, O. (2006). Dinitrocresol'ün (Rat *Rattus norvegicus*) Sıçan Glutasyon-S-Transferaz Enzim Aktivitesine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Becchimanzi, A., Avolio, M., Di Lelio, I., Marinellia, A., Varricchio, P., Grimaldi, A., Eguileor, M., Pennacchio, F., Caccia, S. (2017). Host regulation by the ectophagous parasitoid wasp *Bracon nigricans*. *Journal of Insect Physiology*, 101, 73-81 <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.07.002>
- Beckage, N.E. and Gelman, D.B. (2004). Wasp Parasitoid Disruption of Host Development: Implications for New Biologically Based Strategies for Insect Control. *Annual Review of Entomology*, 49, 299-330.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvur, M. (2004). DNA hasarı analizinde μ - FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 97-103.
- Biddlestone-Thorpe, L., Sajjad, M., Rosenberg, E., Beckta, J.M., Valerie, N.C.K., Tokarz, M., Adams, B., Wagner, A.F., Khalil, A., Gilfor, D., Golding, S.E., Deb, S., Temesi, D.G., Lau, A., O'Connor, M.J., Choe, K.S., Parada, L.F., Lim, S.K., Mukhopadhyay, N.D., Valerie, K. (2013). ATM kinase inhibition preferentially sensitizes p53-mutant glioma to ionizing radiation. *Clinical Cancer Research*, 19 (12), 3189–3200.
- Bischof, C. and Ortel, J., (1996). The effects of parasitism by *Glyptapanteles liparidis* (Braconidae: Hymenoptera) on the hemolymph and total body composition of

- gypsy moth larvae (*Lymantria dispar*, Lymantriidae: Lepidoptera). *Parasitology Research*, 82(8), 687-692.
- Blum, M.S. (1978). Biochemical defenses of insects, *Biochemistry of insects*, Ed. Rockstein, M., *Academic Press*, New York, 11, 465-513
- Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P., Marcos, R. (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, 26, 19-26.
- Bradford, M.M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Burgeot, T., His, E. and Galgani, F. (1995). The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research*, 342, 125-140.
- Büyükgüzel, E. (2009). Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion. *Journal of Economic Entomology*, 102, 152-159.
- Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Snela, M., Erdem, M., Radtke, K., Ziemnicki, K., Adamski, Z. (2013). Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell Biology and Toxicology*, 29, 117-129.
- 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.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretti, G., Landriscina, C. (2004). Rat Liver Glutathione-S-Transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium. *Toxicology*, 15, 200(1), 29-38.
- Čeřovský, V., Slaninová, J., Fučík, V., Hulačová, H., Borovičková, L., Ježek, R., Bednářová, L. (2008) New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. *Peptides*, 29(6), 992-1003. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.02.007>
- Chance, B. and Maehly, A.C. (1955). Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymology*, 2, 764-775.
- Choy, W.N. (2001). Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker, New York, 29-187.

- Collins, A.R., Ma, A.G. and Duthie, S.J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks) and oxidized pyrimidines in human cells. *Mutation Research*, 336, 69-77.
- Cook, S.M. and McArthur, J.D. (2013). Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*, 4, 350-353.
- Cotelle, S. and Ferard, J.F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34, 246-255.
- Cunha, A.O.S., Mortari, M.R., Oliveira, L., Oliveira, R., Carolino, G., Coutinho-Netto, J. dos Santos, W.F. (2005). Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(1), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.05.004>
- Cutler, R.G., Plummer, J., Chowdhury, K., Heward, C. (2005). Oxidative Stress Profiling: Part II. Theory, Technology, and Practice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1055, 136-58.
- Çavaş, T. and Ergene-Gözükara, S. (2003a). Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research*, 534, 93-99.
- Çavaş, T. and Ergene-Gözükara, S. (2003b). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, 8, 538(1-2), 81-91.
- Çavaş, T. and Könen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22 (4), 263-268.
- Çavaş, T. and Ergene-Gözükara, S. (2005). Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 64-70.
- Çelik, A., Mazmancı, B., Çamlıca, Y., Aşkın, A., Çömelekoğlu, U. (2005). Induction of micronuclei by lambda-cyhalothrin in Wistar rat bone marrow and gut epithelial cells. *Mutagenesis* 20, 125-129.

- D'Epiro, N.W. and Lee, T.S. (1999). Bee venom for multiple sclerosis, *Patient Care*, 33(14), 27-31.
- Daggett, D.A., Oberley, D.T., Nelson, S.A., Wright S.L., Kornguth, S. E., Siegel, F.L. (1998). Effects of Lead on Rat Kidney And Liver: GST Expression and Oxidative Stress. *Toxicology*, 128, 191-206.
- Danneels, E.L., Gerlo, S., Heyninck, K., Van-Craenenbroeck, K., Bosscher, K., Haegeman, G., Graaf, D.C. (2014). How the Venom from the Ectoparasitoid Wasp *Nasonia vitripennis* Exhibits Anti-Inflammatory Properties on Mammalian Cell Lines. *Plos-One*, 9 (5), e96825.
- Danneels, E.L., Rivers D.B. and de Graaf D.C. (2010). Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: recent discovery of an untapped pharmacopee, *Toxins (Basel)*, 2,494–516. 10.3390/toxins2040494.
- de la Vega, R.C.R. and Possani, L.D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon*, 43, 865-875.
- Dheilly, N., Maure, F., Ravallec, M., Galinier, R., Doyon, J., Duval, D., Leger, L., Volkoff, A., Missé, D., Nidelet, S. (2015). Who is the puppet master? Replication of a parasitic wasp-associated virus correlates with host behaviour manipulation. *Proceedings of the Royal Society - biological sciences*, 282. doi:10.1098/rspb.2014.2773.
- Di Mascio, P., Murphy, M.E. and Sies, H. (1991). Antioxidan defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 194-200.
- Digilio, M.C., Pennacchio, F. and Tremblay, E. (1998). Host regulation effects of ovary fluid and venom of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Physiology*, 44, 779-784.
- Dikilitaş, M. and Koçyiğit, A. (2010). Canlılarda “Tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *Journal of Agricultural Faculty HR.U*, 14 (2), 77-89.
- Diplock, A. (1998). Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium.
- dos Santos-Pinto., J.R.A., Perez-Riverol, A., Lasa, A.M., Palma, M.S. (2018). Diversity of peptidic and proteinaceous toxins from social Hymenoptera venoms. *Toxicon*, 148, 172-196.

- Doury, G., Bigot, Y. and Periguet, G. (1997). Physiological and biochemical analysis of factors in the female venom gland and larval salivary secretions of the ectoparasitoid wasp *Eupelmus orientalis*. *Journal of Insect Physiology*, 43 (1), 69-81.
- Duthie, G.G., Wahle, K.W.J. and James, W.P.T. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutrition Research Reviews*, 2, 51-62.
- Duthie, S.J. and Collins, A.R. (1997). The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the Comet assay) in human cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 717-724.
- Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O., Cogun, H.Y. (2013). Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and melondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 106, 371-377.
- Endstrom, A. (1992). Venomous and poisonous animals, Krieger Publishing Company, Florida, 51.
- Er, A., Sak, O., Ergin, E., Uçkan, F., Rivers, D.B. (2011a). Venom induced immunosuppression: An overview of hemocyte mediated responses. *Psyche*, Article ID 276376, 14. doi:10.1155/2011/276376.
- Er, A., Uçkan F., Rivers D.B., Sak O. (2011b). Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid *Pimpla turionellae* on hemocytes of the host *Galleria mellonella*. *Journal of Applied Entomology*, 135 (3), 225-236.
- Er, A., Uçkan, F., Rivers D.B., Ergin E., Sak O. (2010). Effects of parasitization and envenomation by the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) on hemocyte numbers, morphology, and viability of its host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) and toward an embryonic cell line from *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 103, 273–282.
- Eren, S.H. (2008). Sıçanlarda Melatonin Desteğinin Akut (Hafif ve Ağır) Egzersizle Çeşitli Dokularda Oluşan Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Durum Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi, Konya.

- Ergin E., Uçkan F., Rivers D.B., Sak O., (2006). *In vivo* and *in vitro* activity of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (L.)(Hymenoptera: Ichneumonidae). *Archives Of Insect Biochemistry And Physiology*, 61 (2), 87-97
- Eskandari, S., Mozdarani, H., Mashinchian-Moradi, A., Shahhosseiny, M.H. (2012). Cytogenetic damage induced by crude oil in *Anodonta cygnea* (mollusca, bivalvia) assessed by the comet assay and micronucleus test. *International Journal of Marine Science and Engineering*, 2 (4), 215-224.
- Fahmy, N.M. (2012). Impact of two insect growth regulators on the enhancement of oxidative stress and antioxidant efficiency of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 5 (1), 137-149.
- Fang, Y.Z., Yang, S. and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 18, 872- 879.
- Felton, G.W. and Duffey, S.S. (1991). Protective action of midgut catalase in lepidopteran larvae against oxidative plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 1715-1732.
- Felton, G.W. and Summers, C.B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29, 187-197.
- Felton, G.W., Donato, K.K., Del-Vecchio, R.J., Duffey, S.S. (1989). Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 2667-2694.
- Fung, S.Y., Lee M.L. and Tan N.H. (2015). Molecular mechanism of cell death induced by king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. *Toxicon*, 96, 38–45.
- Gaeta, L.M., Tozzi, G., Pastore, A., Federici, G., Piemonte, F. (2002). Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clinica Chimica Acta*, 322, 117-120.
- Gajski, G. and Garaj-Vrhovac, V. (2008). Genotoxicity of honeybee venom in human lymphocytes using Comet assay. *Toxicology Letters*, 180, S104. doi:10.1016/j.toxlet.2008.06.421
- Galvani, N.C., Vilela, T.C., Domingos, A.C., Fagundes, M.I., Bosa, L.M, Vechia, I.C.D. Scussel, R., Pereira, M., Steiner, B.T., Damiani A.P., Chavez-Olortegui, C.,

- de Andrade, V.M., de Avila, R.A.M. (2017). Genotoxicity evaluation induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice. *Toxicon*, 140, 132-138
- Gerristen, V.B. (2001). Why pooh luvvs hunny. *Protein Spotlight*, 12, 1-2.
- Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E.D., Plewa, M.J. (2009). The use of higher plants in the comet assay. In: The Comet Assay in Toxicology. *Royal Society of Chemistry*, 98-119.
- Godfray, H.C.J. (1994). Parasitoids. Behavioral and evolutionary ecology, Princeton University Press, New Jersey, 473.
- Gottlieb, D.I. (1988). GABAergic neurons. *Scientific American*, 258 (2), 38-45.
- Grant, D. (1991). Detoxification pathways in the liver. *The Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14, 421-430.
- Greathouse, K.L., Samuels, M., DiMarco, N.M., Criswell, D.S. (2005). Effects of Increased Dietary Fat and Exercise on Skeletal Muscle Lipid Peroxidation and antioxidant capacity in male rats. *European Journal of Nutrition*, 44(7), 429-35.
- Grubor-Lajsic, G., Block, W., Telesmanic, M., Jovanovic, A., Stevanovic, D., Baca F. (1997). Effect of Cold Acclimation on the Antioxidant Defense System of Two Larval Lepidoptera (Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 36, 1-10.
- Haberman, E. (1971). Chemistry, pharmacology, and toxicology of bee, wasp, and hornet venoms. *Venomous animals and their venoms*, Ed: Bücherl, W., Buckley, E.E., 45, Academic Press, New York. 61-93.
- Habig, W.B., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York, A.B.D.
- Han, J., You, D., Xu, X., Han, W., Lu, Y., Lai, R., Meng Q. (2008). An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*, 51 (5), 914-922. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.01.002>
- Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K. (1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*, 399, 125-33.

- Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W., Salamone, M.F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency, gene-tox program. *Mutation Research*, 123, 61-118.
- Heinen, T.E. and Gorini da Veiga, A.B. (2011). Arthropod venoms and cancer. *Toxicon*, 57, 497–511.
- Heinle, H. and Betz, E. (1994). Effects of dietary garlic supplementantation in rat model of atherosclerosis. *Arznei For*, 44, 614-617.
- Hoffmann, J.A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426, 33–38.
- Holle, L., Song, W., Holle, E., Wei, Y., Wagner, T., Yu, X. (2003). A matrix metalloproteinase 2 cleavable melittin/avidin conjugate specifically targets tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *International Journal Of Oncology*, 22 (1), 93–98.
- Hoshina, M.M., Santos, L.D., Palma, M.S., Marin-Morales, M.A. (2013). Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/ antimutagenic effects of the venom of the wasp *Polybia paulista*. *Toxicon*, 72, 64–70.
- Hyrsl, P., Büyükgüzel, E. and Büyükgüzel, K. (2007). The effects of boric acid-induced oxidative stress on antioxidant enzymes and survivorship in *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 66, 23-31.
- Ikonen, S. and Riekkinen P. (1999). Effects of apamin on memory processing of hippocampal-lesioned mice. *European Journal of Pharmacology*, 382, 151-156.
- Isman, M.B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Reviews of Entomology*, 51, 45-66.
- İçen, E., Armutçu, F., Büyükgüzel, K., Gürel, A. (2005). Biochemical stress indicators of greater wax moth *Galleria mellonella* L. exposure to organophosphorus insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 98: 358-366.
- Jones, J.C. (1964). Differential haemocyte counts from unfixed last stage *Galleria mellonella*. *American Zoologist*, 4, 337-346.
- Kaleli, S. (1998). Konak *Galleria mellonella* L. ve endoparazitoid *Pimpla turionellae* L.'nın hemolenf protein bileşimine parazitlemenin etkileri. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Kanost, M.R., Jiang, H. and Yu, X.Q. (2004). Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, 198, 97–105.
- Kansu, Y.A. and Uğur, A. (1984). *Pimpla turionellae* (L.) (Hym., Ichneumonidae) ile konukçusu bazı lepidopter pupaları arasındaki biyolojik ilişkiler üzerinde araştırmalar, *Doğa Bilim Dergisi*, 8 (2), 160-173.
- Kara, A. (2009). Yeni Doğan Ratlarda Amikasinine Bağlı Deneysel Böbrek Hasarı ve Antioksidanların Rolü. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Isparta.
- Karabulut, H. and Gülay, M.Ş. (2016). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.
- Katsu, T., Kuroko, M., Morikawa, T., Sanchika, K., Yamanaka, H., Shinoda, S., Fujita, Y. (1990). Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1027(2), 185-190.
- Kaur, A., Sohal, S.K., Arora, S., Kaur, H., Kaur, A.P. (2014). Effect of plant extracts on biochemistry of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2 (3), 86-92.
- Kavanagh, K. and Reeves, P.E. (2007). Insects and mammalian innate immune responses are much alike. *Microbe*, 2, 596-599.
- Keenan, B., Uçkan, F., Ergin, E., Rivers, D.B. (2007). Morphological and biochemical changes in cultured cells induced by venom from the endoparasitoid, *Pimpla turionellae*. *Recent Advances in the Biochemistry, Toxicity, and Mode of Action of Parasitic Wasp Venoms..* Editör: Rivers D. ve Yoder J. Chapter 5. Research Signpost, Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India. 75-92.
- Kelle, İ. (2007). Kanser Tedavisinde Biyotoksinler, *Dicle Tıp Dergisi*, 34 (3), 226-232.
- Kerkkampa, H., Bagowskib, C., Koolc, J., van Soolingena, B., Vonk, F.J., Vlecken, D. (2018). Whole snake venoms: Cytotoxic, anti-metastatic and antiangiogenic properties. *Toxicon*, 150, 39–49.
- Khamis, A.A.A., Ali, E.M.M., El-Moneim, M.A.A., Abd-Alhaseeb, M.M., El-Magd, M.A., Salim, E.I. (2018). Hesperidin, piperine and bee venom synergistically potentiate the anticancer effect of tamoxifen against breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 1335–1343.

- Kılınçer, N. (1975), Untersuchungen über die hämocytaire abwehrreaktion der puppe von *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera) und über ihre hemmung durch den puppenparasiten *Pimpla turionellae* L. (Hym., Ichneumonidae). *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 78(1-4), 340–370.
- Kimbrell, D.A. and Beutler B. (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Reviews Genetics*, 2, 256–267.
- Knowles, B.H. and Ellar, D.J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 924, 509-518.
- Koçyiğit, A., Keleş, H., Selek, S., Güzel, S., Çelik, H. and Erel, O. (2005). Increased DNA damage and oxidative stress in patients with *Cutaneous leishmaniasis*. *Mutation Research*, 585, 71-78.
- Krishnan, N. and Kodrik, D. (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., Kodrik, D., Kłudkiewicz, B., Sehnal, F. (2009). Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 180-188.
- Krishnan, N. and Sehnal, F. (2006). Compartmentalization of oxidative stress and antioxidant defense in the larval gut of *Spodoptera littoralis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 63, 1-10.
- Krukova, N.A., Dubovskiy, I.M., Gryzanova, E.V., Naumkina, E.A., Glupov V.V. (2007). Cell immunity response of the *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) on *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) parasitize. *Euroasian Entomological Journal*, 6 (4), 361-364.
- Kryukova, N., Dubovskiy, I.; Chertkova, E.; Vorontsova, Y.; Slepneva, I.; Glupov, V. (2011). The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 57, 769–800.
- Kumaravel, T.S. and Jha, A.N. (2006). Reliable comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals. *Mutation Research*, 605, 7-16.

- Kurt, D. and Kayış, T. (2015). Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*. *Turkish Journal of Zoology*, 39, 452-457.
- Kwadha, C.A., Ong'amo, G.O., Ndegwa, P.N., Raina, S.K., Fombong, A.T. (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8, 61.
- Lamraoui, A., Adi-Bessalem, S. And Laraba-Djebari F. (2015). Immunopathologic effects of scorpion venom on hepato-renal tissues: Involvement of lipid derived inflammatory mediators. *Experimental and Molecular Pathology*, 99, 286–296.
- Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27 (4), 969-978.
- Lavine, M.D. and Beckage, N.E. (1995). Polydnviruses: Potent mediators of host insect immune dysfunction. *Parasitology Today*, 11, 368–378.
- Liana W., Lian, H., Lic Q., Hua, A., Liua, S. (2018) The venom of spider *Haplopelma hainanum* suppresses proliferation and induces apoptosis in hepatic cancer cells by caspase activation *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 169–177.
- Lin, A., Zhang, X., Chen, M., Cao, Q. (2007). Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Science*, 19, 596-602. 66
- Liu, X., Chen, D., Xie, L., Zhang, R. (2002). Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54 (8),1083-1089.
- Mano, T., Sinohora, R., Sawai, Y., Oda, N., Nishida, Y., Mokuno, T., Kotake, M., Hamada, M., Masanuga, R., Nakai, A., Nagasaka, A. (1995). Effects of thyroid hormone on coenzyme Q and other free radical scavengers in rat heart muscle. *Journal of Endocrinology*, 145, 131-136.
- Marcussi S., Santosa, P.R.S., Menaldo, D.L., Silveira, L.B., Santos-Filhoa, N.A., Mazzia, M.V., da Silva, S.L., Stábeli, R.G., Antunesa, L.M.G., Soarese, A.M. (2011). Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. *Mutation Research*, 724, 59– 63.
- Marcussi, S., Vinicius, C.T.M. and Eleutério, M.W. (2012a). Genotoxic Potential of *Micrurus corallinus* Venom on the DNA of Human Lymphocytes. *Abstracts Toxins 2012 / Toxicon*, 60 95–248.

- Marcussi, S., Trento, M.V.C., Eleutério, M.W., Palmieri, M.J. (2012b). Comet Assay and Micronucleus Tests to Assess Damage to the DNA of Human Lymphocytes Induced by the *Bothrops jararaca* Venom. *Abstracts Toxins 2012 / Toxicon*, 60 95–248.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G. (2013). Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research*, 758, 41-47.
- Mathews, M.C., Summers, C.B. and Felton, G.W. (1997). Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34, 57-68.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.
- McNamee, J.P., McLean, J.R.N., Ferrarotto, C.L., Bellier, P.V. (2000). Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research*, 466, 63-69.
- Mehta, M. and Brem, S., (2014). Recent Updates in the Treatment of Glioblastoma: Introduction. *Seminars in Oncology*, 41(6), 1–3.
- Meintieres, S., Biola, A., Pallardy, M., Marzin, D. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in *in vitro* clastogenic assays. *Mutagenesis*, 16 (3), 243-250.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983). *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760.
- Missirlis, F., Rahlfs, S., Dimopoulos, N., Bauer, H., Becker, K., Hilliker, A., Phillips, J.P. (2003). A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 384(3), 463-472.
- Moon, D.O., Park S.Y., Heo M.S., Kim K.C., Park C., Ko W.S. (2006). Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *International Immunopharmacology*, 6(12), 1796–1807.
- Moreau, S.J.M. and Asgari, S., (2015). Venom Proteins from Parasitoid Wasps and Their Biological Functions. *Toxins*, 7, 2385-2412.
- Moreno, M., Zurita E. and Giralto, E. (2014). Delivering wasp venom for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 182, 13–21

- Muangphra, P. and Gooneratne, R. (2011). Toxicity of Commercial Neem Extract to Earthworms (*Pheretima peguana*). *Applied and Environmental Soil Science*, Article ID 925950.
- Mukhopadhyay, I., Chowdhuri, D.K., Bajpayee, M., Dhawan, A. (2004). Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 19 (2), 85-90.
- Muranlı-Gökalp, F.D. and Güner, U. (2011). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726 (2), 104-108.
- Nicolaidis, S. (2015). Biomarkers of glioblastoma multiforme. *Metabolism*, 64(3)1,. 22–27.
- Nordberg, J. and Arner, E.S. (2001). Reactive Oxygen Species Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312.
- Olive, P.L., Banath, J.P. and Durand, R.E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, 122 (1), 86-94.
- Ortel, J. and Vogel, W.R. (1989). Effects of lead and cadmium on oxygen consumption and life expectancy of the pupal parasitoid, *Pimpla turionellae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 52(1), 83-88.
- Oruç, E. (2011). Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio* (L.). *Environmental Toxicology*, 26, 571-578.
- Osman, S.E. (1978), Der Einfluß der imaginalernährung und der begattung auf die sekretproduktion der weiblichen genitalanhangsdrüsen und auf die eireifung von *Pimpla turionellae* L. (Hym., Ichneumonidae). *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 85, 113-122.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays:

- A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (11), 3122-3128.
- Owen, M.D. and Sloley B.D. (1988). 5-Hydroxytryptamine in the venom of the honey bee *Apis mellifera* (L.): Variation with season and with insect age. *Toxicon*, 26(6), 577-581.
- Öder, E. (1983), Bal arısı hastalıkları, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, 74.
- Özer, M. (1961) Arı kovanlarında önemli zarar yapan balmumu güvesi (*Galleria mellonella* L.) nin morfoloji, biyoloji ve yayılışı üzerinde araştırmalar. A.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Kürsüsü Çalışmalarından, 26-35.
- Özkaya, A. (2007). Oksidatif Strese Maruz Kalan Ratların Bazı Biyokimyasal Parametrelerine Hesperetin ve Ellagik Asidin Etkisi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Packiam, S.M., Emmanuel, C., Baskar, K., Ignacimuthu, S. (2015). Feeding Deterrent and Genotoxicity Analysis of a novel Phytopesticide by using Comet Assay against *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58 (4), 487-493. 69.
- Parkinson, N., Conyers C. and Smith I. (2002). A venom protein from the endoparasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* is similar to snake venom reprolysin-type metalloproteases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 79, 129–131.
- Parkinson, N. and Weaver, R.J. (1999). Noxious components of venom from the pupa-specific parasitoid *Pimpla hypochondriaca*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 74–83.
- Parkinson, N.M., Conyers, C., Keen, J., MacNicoll, A., Smith, I., Audsley, N., Weaver, R. (2004). Towards a comprehensive view of the primary structure of venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34 (6), 565-71.
- Pavela, R. (2013). Efficacy of naphthoquinones as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. *Industrial Crop and Product*, 43, 745-750.
- Pennacchio, F., Caccia, S. and Digilio, M.C. (2014). Host regulation and nutritional exploitation by parasitic wasps. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 74–79.
- Pennacchio, F. and Strand, M.R. (2006). Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 51, 233–258.

- Pereira Santos, M.C., Palma Carlos, M.L., Pedro, E., Branco Ferreira, M., Spinola, A., Palma Carlos, A.G. (2001). Specific immunotherapy with Hymenoptera venom, *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 1, 249-253.
- Piek, T. (1972). Insect venom and toxins. *Academic Press*, 595.
- Pinto-Silva, C.R., Ferreirab, J.F., Costaa, R.H.R., Belli-Filhoa, P., Creppyc, E.E., Matiasa, W.G. (2003). Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicon*, 41, 93-97.
- Quistad, G.B., Skinner, W.S. and Schooley, D.A. (1988). Venoms of social Hymenoptera-toxicity to the Lepidopteran, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry*, 18(6), 511-514.
- Rady, I., Siddiqui, I.A., Rady, M., Mukhtar, H. (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, 402, 16-31.
- Rencuzoğulları, E. and Topaktaş, M. (2000). Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with the mixtures of carbosulfan, ethyl carbamate and ethyl methanesulfonate. *Cytologia*, 65, 83-92.
- Richards, E.H. and Parkinson, N.M. (2000). Venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* adversely affects the morphology, viability, and immune function of hemocytes from larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76, 33-42.
- Rivers, D.B., Ruggiero, L. and Hayes, M. (2002). The ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Insect Physiology*, 48, 1053–1064.
- Rivers, D.B., Crawley, T. and Bauser, H. (2005). Localization of intracellular calcium release in cells injured by venom from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) and dependence of calcium mobilization on G-protein activation. *Journal of Insect Physiology*, 51, 149–160.
- Rivers, D.B., Uçkan, F., and Ergin, E. (2006). Characterization and biochemical analyses of venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 61 (1), 24-41.

- Saidoune-Malek, I., Ait-Lounis, A. and Laraba-Djebari, F. (2018). TNF- α antagonist improves oxidative stress and lipid disorders induced by scorpion venom in the intestinal tissue. *Acta Tropica*, 185, 307–313.
- Salman M.M.A. and Hammad S. (2017). Oxidative stress and some biochemical alterations due to scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) crude venom in rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 91, 1017-1021 doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.124
- Sankarapandi, S. and Zweier, J.L. (1999). Evidence against the Generation of Free Hydroxyl Radicals from the Interaction of Copper, Zinc-Superoxide Dismutase and Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (49), 34576- 34583.
- Sarfo-Poku, C., Eshun O. and Lee, K.H. (2016). Medical application of scorpion venom to breast cancer: A mini-review. *Toxicon*, 122, 109-112.
- Schmidt, J.O. (1982). Biochemistry of insect venoms. *Annual Review of Entomology*, 27, 339-368.
- Senthil-Nathan, S. (2013). Physiological and biochemical effect of neem and other meliaceae plants secondary metabolites against lepidopteran insects. *Frontiers in Physiology*, 4, 1-17.
- Shanbhag, V.K.L. (2015). Applications of snake venoms in treatment of cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5 (4), 275-276.
- Siddique, H.R., Chowdhuri, D.K., Saxena, D.K., Dhawan, A. (2005). Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 20 (4), 285-290.
- Silva, M.A., Lopes, D.S., Teixeira, S.C., Gimenes, S.N.C., Azevedo, F.V.P.V., Polloni, L., Borges, B.C., da Silva, M.S., Barbosa, M.J., de Oliveira Júnior, R. J., Elias, M.C., da Silva, C.V., Yoneyama, K.A.G., de Melo Rodrigues, V., Rodrigues, R.S. (2018). Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys-49 phospholipase A2 (PLA2) homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 311–319.
- Simkó, M., Kriehuber, R., Weiss, D.G., Luben, R.A. (1998). Effects of 50 Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and non transformed human cell lines. *Bioelectromagnetics*, 19, 85-91.

- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Sisakht, M., Mashkani, B., Bazi, A., Ostadi, H., Zare, M., Avval, F.Z., Sadeghnia, H.R., Mojarad, M., Nadri, M., Ghorbani, A., Soukhtanloo, M. (2017). Bee venom induces apoptosis and suppresses matrix metalloproteinase-2 expression in human glioblastoma cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 324–328.
- Siu, W.H.L., Caob, J., Jack, R.W., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., Xud, L., Lama, P.K.S. (2004a). Application of the comet and micronucleus assays to the detection of genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology*, 66, 381-392.
- Siu, W.H., Mak, E., Cao, J., De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., Lam, P.K. (2004b). Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1317-1325.
- Sobral, F., Sampaio, A., Falcao, S., Queiroz, M.J.R.P., Calhelha, R.C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R. (2016). Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 94, 172-177.
- Son, D.J., Lee, J.W., Lee, Y.H., Song, H.S., Lee, C.K., Hong, J.T. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds, *Pharmacology & Therapeutics*, 115: 246–270.
- Strand, M.R., Beck, M.H., Lavine, M.D., Clark, K.D. (2006). Microplitis demolitor bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 61, 134–145.
- Sun, Y., Oberley, L.W. and Li, Y. (1988). A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clinical Chemistry*, 34 (3), 497-500.
- Şekeroğlu-Atlı, Z. and Şekeroğlu, V. (2011). Genetik Toksikite Testleri. Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 4 (3), 221-229.
- Tanaka, T. and Vinson, S.B. (1991) Depression of prothoracic gland activity of *Heliothis virescens* by venom and calyx fluids from the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps*. *Journal of Insect Physiology*, 37(2), 139-144.

- Tekcan, M. (2009). Oksidatif Stres-Antioksidan Sistemler ve Testis. Derleme, Infertilite, Androloji Bülteni, 37, 131-136.
- Terwilliger, T.C., Weissman, L. and Eisenberg, D. (1982). The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophysical Journal*, 37 (1), 353-361.
- Thiboldeaux, R.L., Lindroth, R.L. and Tracy, J.W. (1998). Effects of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on midgut morphology and glutathione status in Saturniid moth larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120, 481-487.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Timbrell, J. (1991). Principles of Biochemical Toxicology, In London Ed: Taylor and Francis; 73-124.
- Tosun, N., Karabay, N.U. and Sayım, F. (2001). Pesticide usage and their potential adverse impact of living organisms. *Anadolu : Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü dergisi = Journal of Aegean Agricultural Research Institute*, 11, 113-125.
- Tülüce, Y. (2005). Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Subakut ve Subkronik Uygulamalarının Ratların Eritrosit ve Çeşitli Dokularındaki Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Glutasyon Ve Lipid Peroksidasyon Seviyeleri Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Van.
- Türkez, H., İncekara, Ü. and Erman, O. (2010). Biomonitoring of the genotoxic potentials of two edible insects species *in vitro*. *Türk Entomoloji Dergisi*, 34 (4), 411-417.
- Uçkan F., (1999). The Morphology of the Venom Apparatus and Histology of Venom Gland of *Pimpla turionellae* (L.) (Hym; Ichneumonidae) Females. *Turkish Journal of Zoology*, 23, 461-466
- Uçkan, F., Er, A. and Ergin, A. (2010). Levels of encapsulation and melanization in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized and envenomated by *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Journal of Applied Entomology*, 134, 718-726.

- Uçkan, F., Ergin, E., Rivers, D.B., Gencer, N. (2006). Qualitative and quantitative characterization of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Archives Of Insect Biochemistry And Physiology*, 63 (4), 177-187.
- Uçkan, F. and Gülel, A. (1990). Endoparazitoit *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişilerinde venom aparatının yapısı ve venomun başlıca kimyasal grubunun tayini, X. Ulusal Biyoloji Kongresi, Erzurum, 73-83.
- Uçkan, F., Sinan, S. and Savasci, S. (2004). Determination of venom components from the endoparasitoid wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals Of The Entomological Society Of America*, 97 (4), 775-780 ,
- Uçkan, F., Sak, O. (2010). Cytotoxic Effect of Cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Larval Hemocytes. *Ekoloji*, 19, 75, 20-26.
- Urso, M.L. and Clarkson, P.M. (2003). Oxidative Stress, Exercise and Antioxidant Supplementation. *Toxicology*, 189 (1-2), 41-54.
- Ündeğer, Ü. and Başaran, N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology*, 79, 169-176.
- Van-Goethem, F., Lison, D. and Kirsh-Volders, M. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt- tungsten carbide. *Mutation Research*, 392, 31.
- Venier, P., Maron, S. and Canova, S. (1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzowaxpyrene. *Mutation Research*, 390, 33-44.
- Vesely, D.L., Vesely, B.A., Eichelbaum, E.J., Sun, Y., Alli, A.A., Gower, W.R. (2007). Four cardiac hormones eliminate up to two-thirds of human breast cancers in athymic mice. *In Vivo*, 21(6), 973–978.
- Vinson, S.B. (1990). How parasitoids deal with the immune system of their host: An overview. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 13, 3–27.
- Vinson, S.B. and Iwantsch, G.F. (1980). Host Suitability for Insect Parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 25, 397.

- Vural, N. (2005). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 115-129.
- Weisel-Eichler, A. and Libersat, F. (2004). Venom effects on monoaminergic systems. *Journal of Comparative Physiology A*, 190, 683-690
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F. (2007). Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*, 30, 133-142. 75
- Wharton, R.A. (1993). Bionomics of the Braconidae. *Annual Review of Entomology*, 38, 121.
- Woźnicki, P., Lewandowska, R., Brzuzan, P., Ziomek, E., Bardega, R. (2004). The level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussels *Anodonta woodiana* exposed to. *Acta Toxicologica*, 12 (1), 41-45.
- Yagi, K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology*, 108, 101-106.
- Yasuhara, T., Mantel, P., Nakajima, T., Piek, T. (1987). Two kinins isolated from an extract of the venom reservoirs of the solitary wasp *Megascolia flavifrons*. *Toxicon*, 25 (5), 527-535.
- Yazgan, Ş. (1981). A meridic diet and quantitative effects of Tween 80, fatty acid mixtures and inorganic salts on development and survival of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. *Entomology*, 91, 433-441.
- Yeh, S.P., Sung, G.T., Chang, C.C., Cheng, W., Kuo, M.N. (2005). Effects of an organophosphorus insecticide, trichlorfon, on hematological parameters of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture*, 243, 383-392.
- Yılayaz, Ö. (2008). Chlorpyrifos Ethyl (Pestisit; İnsektisit)'in *Barbus rajanorum mystaseus* (Heckel,1843) Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Eritrosit Mikronukleus Testi İle Belirlenmesi. Fırat Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı, Elazığ.
- Yıldızdaş, H.Y. (2003). Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulan ve Growth Hormon Uygulanan Yenidoğan Ratlarda Beyin Dokusunda Piruvat Kinaz Aktivitesi,

- Antioksidan Sistem ve Lipit Peroksidasyonu. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Neonatoloji Bilim Dalı, Adana.
- Yu, Q., Fang, S., Zuo, W., Dai, F., Zhang, Z., Lu, C. (2011). Effects of organophosphate phoxim exposure on certain oxidative stress biomarkers in the silkworm. *Journal of Economic Entomology*, 104: 101-106.
- Yu, S.J. and Abo-Elghar, G.E. (2000). Allelochemicals as Inhibitors of Glutathione S-Transferases in the Fall Armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68, 173-183.
- Zang, Y., Zhong, Y., Luo, Y., Kong, Z.M. (2000). Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 108 (2), 271-278.
- Zargan, J., Umar, S., Sajad, M., Naime, M., Ali, S., Khan, H.A. (2011). Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7). *Toxicology in Vitro*, 25 (8), 1748–1756.
- Zeiger, E. (2004). History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 363-71.
- Zenkov, N.K., Lankin, V.Z. and Men'shchikova, E.B. (2001). Oxidation Stress: Biochemical and Pathophysiological Aspects. State Publishing House of Biochemistry and Biology Literature, Moscow, Russia, 1-343.
- Zhang, G., Schmidt, O. and Asgari, S. (2006). A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. *Developmental and Comparative Immunology*, 30, 756–764.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Selin ÇİM

Yabancı Dil: İngilizce

Doğum yeri ve yılı: ESKİŞEHİR, 17 Ekim 1991

Çalışmakta olduğu birim adresi: Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Yunus Emre Kampüsü, Tepebaşı, Eskişehir, 26470 (*Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerinde Araştırmacı olarak yer almaktadır*)

İletişim bilgileri: E mail: selincimsc@gmail.com, Tel: 05077157336

Ayrıntılı öğrenim geçmişi:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji /Lisans	Anadolu Üniversitesi	2009-2014
Yüksek Lisans	Biyoloji ABD/ Zooloji BD	Anadolu Üniversitesi- (Eskişehir Teknik Üniversitesi)	2015- 2018

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı

Endoparazitoit *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Venomunun Böcek ve Memeli Hücrelerinde Toksikolojik Etkilerinin Araştırılması

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe AK CAN

Bugüne kadar projelerde yaptığı görevler:

1. Endoparazitoid *Pimpla turionella* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Venomunun Böcek ve Memeli Hücrelerinde Toksikolojik Etkilerinin Araştırılması Eskişehir Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: 1707F458 2017-Devam Ediyor.
Görevi: Araştırmacı.
2. Endoparazitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae) zehrinin konağı *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Antioksidan Enzimleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: 1605F387, (2016-2017), **Görevi: Araştırmacı.**

3. Parazitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae) Dişilerinde Zehir Kesesinin Yaşa Bağlı Değişiminin Belirlenmesi. Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: 1505F235 (2015-2016), **Görevi: Bursiyer.**

Katılan Kurslar/Stajlar ve Sertifikalar

1. Anadolu Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifika Programı, Pedagojik Formasyon Sertifikası, 2016-2017.
2. Belçika, Gent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Entomoloji ve Arı Patolojisi Laboratuvarı'na yapılan ziyarette Hücre kültürü, HPLC, MTT, Luciferaz ve Galaksidaz Assay konuları hakkında bilimsel yeterlilikler kazanılmıştır. 18-27/04/2017.
3. Kocaeli Üniversitesi Sürekli Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi, VI. Temel Klinik Proteomiks Kursu Katılım Belgesi, 04-05/02/2017.
4. Anadolu Üniversitesi, “Çalışanların İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Programı”, Katılım Belgesi, Ocak 2016
5. Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, “Uygulama Projeleri Sunum Etkinliği”, Katılım Sertifikası, Haziran 2014

Başarı Belgeleri

1. Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2013-2014 Eğitim Yılı, Onur Belgesi

Eserler Listesi

A. Uluslararası (SCI ve SCI-Exp taranan) dergilerde yayımlanan makaleler:

B. Ulusal dergilerde yayımlanan makaleler:

C. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

- C.1. Duman, E., Çim, S., Bayuk, B.G., Altuntaş H., Age Related Changes of Venom Glands From Female Parasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera; Ichneumonidae), The International Conference On Science, Ecology And Technology I (Iconsete'2015 – Vienna), 24/08/2015, **Poster Sunumu.**

Bilimsel Kazanımlar

Depo ve bitki zararlısı böceklerin kültüre edilmesi ve kültür ortamı için gereken ortam koşullarının oluşturulması konusunda tecrübelidir. Özellikle zararlılar ile mücadelede model organizma olarak kullanılan bal mumu güvesi *Galleria mellonella*'nın kültüre edilmesinde 5 yıllık tecrübesi bulunmaktadır.

Zararlı böceklerde doğal düşman olarak etki eden parazitoit böceklerin kültüre edilmesi ve kültür ortamı için gereken ortam koşullarının oluşturulması konusunda tecrübelidir. Özellikle zararlılar ile mücadelede model organizma olarak kullanılan bal mumu güvesi *Galleria mellonella*'ya karşı biyolojik düşman olan *Pimpla turionellae*'nin kültüre edilmesinde 5 yıllık tecrübesi bulunmaktadır.

Canlı kültürün yetiştirilmesinde canlıya uygun ortam koşullarının sağlandığı İKLİM ODASI'nın kurulmasında; sıcaklık, nem ve fotoperiyot koşullarının takibinde kullanılan elektrikli kontrol panolarının ayarlanmasında; kontrol panellerinin bilgisayarlı ortamda uzaktan takip edilmesi ve kayıt altına alınmasında kullanılan **OPIK** sisteminin eğitiminde tecrübesi bulunmaktadır.

Ekolojik ya da biyolojik olarak önemli bir ajanın model organizma üzerinde **biyokimyasal ve moleküler** etkilerinin belirlenmesi konusunda deneylerin tasarlanması; deney süresince canlıya ait biyolojik verilerin elde edilmesi; elde edilen veriler ile lethal ölüm dozu ve lethal ölüm zamanlarının istatistiki yöntemler (**SPSS; Probit Analizi**) ile belirlenmesi konusunda tecrübelidir. 82

Model organizma üzerinde **oksidatif stres markerlarının** belirlenmesinde antioksidan enzim analizlerinin gerçekleştirilmesi konusunda deneysel süreçlerde kullanılan cihazlar (*Spectra Max M2, BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu ve Gen5 Programı, Shimadzu UV*), uygulanan metodlar, deney sonuçlarının istatistiksel analizlerinin yapılması (**SPSS; T- testi, One-Way ANOVA, Two-Way ANOVA**) ile elde edilen sonuçların biyolojik ve fizyolojik olarak yorumlanması konusunda tecrübelidir.

Çeşitli zenobiyotiklerin **böcek hücresel bağışıklık sistemi** üzerindeki etkisinin belirlenmesinde kullanılan toplam hemosit sayısı, farklı hemosit sayısı, hücre yayılması, apoptoz/nekroz, nodülasyon, enkapsülasyon deneylerinin yapılması ve sonuçların yorumlanması konusunda tecrübelidir.

DNA hasar tespitinin belirlenmesinde kullanılan **COMET (Tek Hücre Jel Elektroforezi)** yöntemi ile **Mikronukleus testinin** yapılması konusunda tecrübelidir.

Moleküler çalışmalarda sıklıkla kullanılan **DNA/protein izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve gen çoğaltılması, Agaroz Jel Elektroforezi, Akrilamid Jel Elektroforezi, Proteinlerin kalitatif ve kantitatif incelenmesi, SDS- PAGE, 2D- Jel Elektroforezi, Western Blot, Kromotografik analizler (HPLC, FPLC),**

MALDI-TOF ile böcek ve memeli hücre kültürü, MTT, Alamar Blue, Galaksidaz, Luciferaz, COMET assay, CB-MN Flourosans/ Faz kontrast mikroskop kullanımı gibi konularda tecrübelidir.

Laboratuvar çalışmalarında deney ortamının hazırlanması, deneysel çalışmalar için gerekli olan makine-teçhizat, kimyasal ve sarf malzemelerinin proje bütçe kapsamında belirlenerek alınması konusunda tecrübelidir.

Bilimsel araştırma projesinin yazılabilmesi için, hipotez oluşturma, amaç ve hedeflerin belirlenmesi, gerekli literatür kaynağının oluşturulması, deneysel yöntemlerin belirlenmesi, bütçe ve insan kaynağı açısından projenin yapılabilirliğinin değerlendirilmesi konusunda; projenin gerekli zaman çizelgesinde gerçekleştirilmesi, verilen iş paketlerine uygun hareket edilmesi ile ara rapor ve kapanış raporlarının hazırlanması konusunda; proje çıktılarının ulusal ve uluslararası kongrelerde sunumu ile bilimsel çıktı (makale) olarak hazırlanması konusunda tecrübelidir.

Anadolu Üniversitesi'nde verilmekte olan zorunlu ders ***BİY341 Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı*** dersi kapsamında uygulamalarda kullanılan **BIOPAC Eğitim Seti** ve uygulanan fizyoloji deneyleri konusunda 4 yıllık tecrübelidir.

18-27/04/2017 tarihlerinde **Belçika, Ghent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Entomoloji ve Arı Patolojisi (Ghent University, Laboratory of Molecular Entomology and Bee pathology) Laboratuvarında** yüksek lisans projesi aracılığıyla yapmış olduğu bilimsel ziyaret sonucunda, laboratuvarında yapılan memeli ve böcek hücre kültürü, parazitoit zehrinin antienflamatuar etkisinin belirlenmesine yönelik deneysel analizlerde, zehrin HPLC cihazında fraksiyonlanmasında ve proteomiks konusunda yapılan çalışmalara da gönüllü olarak katılmış ve bu deneysel yöntemler ile ilgili yeni tecrübeler edinmiştir.

MESLEKİ BECERİLER

- Canlı böcek kültürü yetiştirilmesi ve bakımı
- Böcek hemolenf metabolitlerin (protein, lipit, karbonhidrat) analizi
- Antioksidan enzim analizleri
- Elektoroforez deneyleri (SDS-PAGE, Agaroz Jel Elektroforezi)
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
- Genotoksitite testleri (Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET), Mikronukleus)

- Proteomiks analizi (2D Elektroforez, Western Blot, MALDI-TOF)
- HPLC ve FPLC kullanarak protein saflařtırma
- Böcek ve memeli kültürü
- Fizyoloji deneyleri (Elektromiyografi, Elektrokardiyografi, Sinir Fizyoljisi, Solunum ve Sindirim Deneyleri)
- Toplam hemosit sayısı, Farklı hemosit sayısı, Hücre yayılması (Cell-spreading)
- Apoptoz/Nekroz, Nodülasyon, Enkapsülasyon

