



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AZADIRACHTIN'IN *Galleria mellonella*
LARVALARININ BAĞIŞIKLIK
SİSTEMİNE ETKİSİ

EDA CANSU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Z. Ulya NURULLAHOĞLU

İSTANBUL, 2018



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AZADIRACHTIN'IN *Galleria mellonella*
LARVALARININ BAĞIŞIKLIK
SİSTEMİNE ETKİSİ

EDA CANSU
(520116011)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Z. Ulya NURULLAHOĞLU

İSTANBUL, 2018

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Eda CANSU'nun
"Azadirachtin'in *Galleria mellonella* Larvalarının Bağışıklık Sistemine Etkisi"
başlıklı tez çalışması, 09 Temmuz 2018 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından
başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

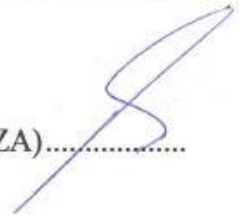
Prof.Dr. Z. Ulya NURULLAHOĞLU (Danışman)

Marmara Üniversitesi (İMZA) 

Prof. Dr. Nagihan Gülsoy (Üye)

Marmara Üniversitesi (İMZA) 

Prof Dr. Tuncay Orta (Üye)

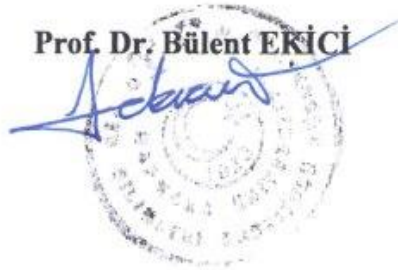
İstanbul Üniversitesi (İMZA) 

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 6./8./18 tarih ve
2018/19.22. sayılı kararı ile Eda CANSU'nun Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında
Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca her türlü yardım eden, sabır gösteren, hoşgörüsünü esirgemeyen, doğru düşünüp doğru kararlar vermeme sağlayan çok saygıdeğer hocam Prof. Dr. Zahide Ulya NURULLAHOĞLU'na içtenlikle teşekkür ederim. Marmara Üniversitesi'ndeki laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Filiz VARDAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini aktaran kıymetli laboratuvar arkadaşlarım Gözde CANLI, Gamze Gül DURULAR ve Müjgan ŞAHİN'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca birçok başarıyı borçlu olduğum, hep yanımda olduklarını hissettiğim ve iyi ki varlar dediğim değerli arkadaşlarım Merve Hilal ÇETİNKAYA, Gülişan SADIKOĞLU ve Kübra BAKALI, Merve YAĞIZ, Sefa Elif ERDEM, Sinan AKTAŞ Gamze KURTULUŞ, Barış GÖKALSIN ve Tunahan Irmak BAŞARAN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Tüm yaşamımı borçlu olduğum, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim, beni özveri ile büyüten canım babam İsmet CANSU'ya, canım annem Sevim CANSU'ya, hayatımın en büyük güzellikleri olan ablam Nur Seda CANSU'ya ve kardeşim Yorum Mail CANSU'ya sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi, BAPKO, FEN-C-YLP-170118-0017 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Temmuz, 2018

Eda CANSU

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SEMBOLLER	vii
KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	1
1.2. Azadirachtin'in Özellikleri ve Toksik Etkileri	2
1.3. Azadirachtin ile İlgili Yapılan Çalışmalar	6
1.4. Böceklerde Bağışıklık Sistemi ve Hemositler	9
1.5. Böceklerde Bağışıklık Sistemi ve Hemositler ile İlgili Yapılan Çalışmalar	18
1.6. Böcek Hemositlerinde Apoptoz Mekanizması	21
1.7. Böcek Hemositlerinde Apoptozla İlgili Yapılan Çalışmalar	23
1.8. <i>Galleria mellonella</i> L. 1758 (Büyük Balmumu Güvesi)'nin Biyolojisi	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM	29
2.1. <i>G. mellonella</i> Kültürünün Oluşturulması ve Devamının Sağlanması	29
2.2. Azadirachtin'in Force-Feeding Yöntemi ile Böceklere Uygulanması	30
2.3. Apoptotik İndeks, Mitotik İndeks ve Mikronukleus Durumu	32
2.4. Enkapsülasyon ve Melanizasyon	34
2.5. İstatiksel Analiz	35
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
3.1. AZA'nın İmmün Sisteme Etkisi	36
3.2. Farklı Dozlardaki AZA'nın <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemositlerinde Apoptotik İndeks, Mitotik İndeks ve Mikronukleus Oluşumuna Etkisi	36

3.2.1. Farklı Dozlardaki AZA'nın <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemositlerinde Apoptotik İndekse Etkisi	36
3.2.2. Farklı Dozlardaki AZA'nın <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemositlerinde Mitotik İndekse Etkisi	40
3.2.3. Farklı Dozlardaki AZA'nın <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemositlerinde Mikronukleus Oluşumuna Etkisi	41
3.3. Farklı Dozlardaki AZA'nın <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemositlerinde Enkapsülasyon ve Melanizasyon Davranışı	43
3.3.1. Farklı Dozlardaki AZA'nın <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemositlerinde Enkapsülasyona Etkisi	43
3.3.2. Farklı Dozlardaki AZA'nın <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemositlerinde Melanizasyona Etkisi	48
4. SONUÇLAR	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	68

ÖZET

AZADIRACHTIN'IN *Galleria mellonella* LARVALARININ BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNE ETKİSİ

Neem ağacı tohumlarından elde edilen Azadirachtin (AZA)'nın böceklerde toksik etkileri olduğu bilinmektedir. AZA'nın kimyasal insektisitlere oranla çevresel ve ekonomik zararları daha azdır. Ayrıca memeliler üzerinde toksik etkilerinin olmaması AZA için bir kullanım tercihi oluşturmaktadır.

Çalışmamızda AZA'nın böcek hemositleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmada kullanılan büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella*, bilimsel araştırmalar için iyi bir model organizma olması ve laboratuvar koşullarında kolay ve hızlı yetiştirilmesi sebebiyle tercih edilmiştir. Deneylerde son evre larvalar (0.16-0.17 g) kullanıldı. Dört farklı dozda AZA (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 µg/larva) böceklere force-feeding yöntemi ile uygulandı. Larvalar force-feeding öncesi 3 saat aç bırakıldı. Force-feeding uygulamasından 48 saat sonra böcekler incelemeye alındı. Bir grup larvaya enkapsülasyon tepkimesi için Sephadex A-25 cam boncuk enjekte edildi ve bu işlemden sonraki 4 ve 24 saatte gösterdikleri enkapsülasyon ve melanizasyon tepkimeleri gözlemlendi. Diğer bir grup larvanın hemolenfleri alındı. Boyama işleminden sonra hemositlerin gösterdiği apoptoz ve nekroz tepkimeleri, mitotik indeks ve mikronukleus oluşumları incelendi.

AZA'ya bağlı olarak tüm dozlarda canlı hücre sayısında azalma tespit edildi. AZA dozlarına bağlı olarak geç apoptoz ve nekroz verilerinde artış gözlemlendi. Nekrotik hücre sayısında 0.5 ve 1.0 µg/larva AZA uygulanan gruplarda önemli bir artış belirlendi. 0.5 µg/larva dozu 0.5 µg/larva AZA dozunun mitotik hücre sayısında önemli bir artışa sebep olduğu tespit edildi. Mikronukleus oluşumunun 1.5 ve 2.0 µg/larva AZA dozlarında arttığı belirlendi. 0.5, 1.0 ve 1.5 µg/larva AZA dozlarında 4 saatlik enkapsülasyon yanıtında artış bulunurken 24 saatlik enkapsülasyon yanıtında fark tespit edilmedi. 4 saatlik melanizasyon yanıtında tüm AZA dozlarında ve etanol uygulanan grupta artış gözlemlendi. AZA uygulamasına bağlı olarak 24 saatlik melanizasyon yanıtında azalma gözlemlendi.

Sonuç olarak AZA, *G. mellonella* larvalarının bağımsıklık sistemini etkilemiş ve genotoksik hasara sebep olmuştur.

Temmuz, 2018

Eda CANSU



ABSTRACT

EFFECT OF AZADIRACTIN ON IMMUNE SYSTEM OF *Galleria mellonella* LARVAE

Azadirachtin (AZA) obtained from Neem tree seeds is known to have toxic effects on insects. Environmental and economic harms of AZA are less than chemical insecticides. In addition, it is preferred because it has no toxic effect on mammals.

In our study, the effects of AZA on insect hemocytes were investigated. The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* used in the study was preferred because of being an excellent model organism for scientific research and easy and fast growing in laboratory conditions. Last instar larvae (0.16-0.17 g) were used for the experiments. Four different doses of AZA (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 µg/larva) were applied to larvae via force-feeding method. Larvae were starved for 3 h before feeding. Larvae were investigated 48 hours after force-fed. Sephadex A-25 glass beads were injected into a group of larvae for encapsulation reactions, and encapsulation and melanization reactions were determined at 4 and 24 hours after this procedure. The hemolymph was taken from another group of larvae. The apoptosis and necrosis reactions, micronucleus and mitotic index of the hemocytes were investigated in preparations prepared with hemolymph after dyeing.

The number of viable cells decreased in all doses due to AZA. There was an increase in late apoptosis and necrosis data depending on the doses of AZA. There has been a significant increase in the number of necrotic cells in 0.5 and 1.0 µg/larvae of AZA applied groups. 0.5 µg/larvae AZA caused a significant increase in the number of mitotic cells. The significant increase of micronucleus formation was found in the groups applied to 1.5 and 2.0 µg/larvae doses. 0.5, 1.0 and 1.5 µg/larva doses caused an increase in 4 hours encapsulation response, but did not have effect at 24 hours encapsulation response. There was increase at 4 hours melanization response in all AZA doses and groups of ethanol. Depending on AZA application, a decrease was observed at 24 hours melanization response.

As a result of this study, AZA affected the immune system of *G. mellonella* larvae and caused genotoxic damages.

Temmuz, 2018

Eda CANSU

SEMBOLLER

°C	: Derece Celcius
%	: Yüzde
g	: Gram
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
ppm	: Parts Per Million (milyonda bir birim)

KISALTMALAR

AO	: Acridine Orange
AZA	: Azadirachtin
Ca²⁺	: Kalsiyum (İyonize)
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DGE	: Digital Gene Expression
dH₂O	: Distile Su
Dopa	: Dihydroxy-phenyl-alanine
EB	: Ethidium Bromide
GA₃	: Gibberellik Asit
IAA	: İndol-3 Asetik Asit
IPM	: Integrated Pest Management
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
proPO	: Profenoloksidaz
PRR	: Pattern-Recognition Receptors
PSP	: Plasmacyte Spreading Peptide
RNS	: Reaktif Nitrojen
ROS	: Reaktif Oksijen
TiO₂	: Titanyum Dioksit
VRE	: Venom Reservoir Equivalent

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1.1. <i>A. indica</i> 'nın ürünleri	5
Şekil 1.2. AZA'nın moleküler yapısı	5
Şekil 1.3. Böcek hemositlerinin görünüşleri.	12
Şekil 1.4. Hemositlerdeki PO yolağıyla gerçekleşen tirozin metabolizması	17
Şekil 1.5. <i>G. mellonella</i> dişi pupu	27
Şekil 1.6. <i>G. mellonella</i> erkek pupu	27
Şekil 1.7. <i>G. mellonella</i> 'nın yaşam döngüsü	28
Şekil 2.1. Larvaların Azadirachtin ile force-feeding yöntemi kullanılarak beslenmesi	31
Şekil 2.2. Hemolenfin Ethidium Bromide ve Acridine Orange ile boyanması	33
Şekil 3.1. <i>G. mellonella</i> larvalarında canlı hemosit	38
Şekil 3.2. <i>G. mellonella</i> larvalarında erken apoptotik hemosit	38
Şekil 3.3. <i>G. mellonella</i> larvalarında geç apoptotik hemosit	39
Şekil 3.4. <i>G. mellonella</i> larvalarında nekrotik hemositler	39
Şekil 3.5. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde apoptotik indekse etkisi	40
Şekil 3.6. <i>G. mellonella</i> larvalarında mitoz bölünme evresindeki hemosit	41
Şekil 3.7. <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde mikronukleus oluşumu	42
Şekil 3.8. AZA ile beslenmiş <i>G. mellonella</i> larvalarının disekte edilmesi	43
Şekil 3.9. AZA ile beslenmiş <i>G. mellonella</i> larvalarından disekte edilmiş Sephadex DEAE A-25 boncukları	44
Şekil 3.10. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde 4 saatlik enkapsülasyon davranışına etkisi	46
Şekil 3.11. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde 24 saatlik enkapsülasyon davranışına etkisi	48
Şekil 3.12. AZA ile beslenmiş <i>G. mellonella</i> larvalarından disekte edilmiş ve melanizasyon durumunu gösteren Sephadex DEAE A-25 boncuklar	49

Şekil 3.13. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde 4 saatlik melanizasyon durumuna etkisi	51
Şekil 3.14. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde 24 saatlik melanizasyon durumuna etkisi	54



TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo 3.1. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde apoptotik indekse etkisi	39
Tablo 3.2. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde mitotik indekse etkisi	41
Tablo 3.3. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde mikronukleus oluşumuna etkisi	43
Tablo 3.4. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde 4 saatlik enkapsülasyon davranışına etkisi	45
Tablo 3.5. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde 24 saatlik enkapsülasyon davranışına etkisi	47
Tablo 3.6. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde 4 saatlik melanizasyon durumuna etkisi	51
Tablo 3.7. AZA'nın <i>G. mellonella</i> larva hemositlerinde 24 saatlik melanizasyon durumuna etkisi	53

1.GİRİŞ

1.1. Amaç

Günümüzde pestisitlerin verdiği ekolojik ve ekonomik zararlar bilinmektedir. Dünya üzerindeki pestisitlerin önemli bir kısmı da insektisit olarak kullanılmaktadır (Pimentel ve Levitan, 1986). Böceklerle karşı mücadelede kullanılan insektisitlerin çoğu yararlı böcek ve bitkileri direkt, insanları ise dolaylı yoldan etkilemektedir. Ayrıca böcekler zamanla insektisitlere karşı bağışıklık kazanarak direnç göstermeye başlamışlardır. Bu sebeple, doğal maddelerden elde edilen biyoinsektisitler kullanılmaya başlanmıştır (Lowery ve Isman, 1995; Miller ve Urtz, 1998; Sak ve ark., 2006; Sezer ve Ozalp, 2011).

Azadirachtin (AZA) tarım zararlılarına karşı kullanılan, oldukça büyük bir öneme sahip ve neem tohumlarından elde edilen maddedir (Murthy ve Saxena, 1998). Böceklerle karşı yüksek etkili olduğu için Neem ağacından elde edilen AZA insektisit olarak uzun süredir kullanılmaktadır (Spollen ve Isman, 1996). AZA'nın 200 türden fazla böcekte besin alımını engellediği, büyümeyi yavaşlattığı, yumurta veriminde olumsuz etki gösterdiği ve toksik bir madde olduğu bilinmektedir (Spollen ve Isman, 1996; Göçmen ve ark., 2007). Larvalardaki gelişimi etkilediği gibi puplaşma evresinde de gelişimi durdurma gibi etkilere sahiptir (Murthy ve Saxena,1998). AZA'nın memelilere karşı gösterdiği zararlı etki ise yüksek değildir (Charbonneau ve ark., 2007; Bezzar-Bendjazia ve ark., 2016; Er ve ark., 2017).

Böcek kan hücreleri olan hemositler çok sayıda fizyolojik fonksiyona sahiptirler. Tüm vücudu dolaşan bu hücrelerin fagositoz, nodülasyon, enkapsülasyon gibi bağışıklık görevleri vardır (Perveen ve Ahmad, 2016). Böcekler sahip oldukları açık dolaşım sisteminden dolayı zararlı maddelere karşı hemositler aracılığı ile oldukça hızlı yanıtlar verebilmektedirler (Dubovskiy ve ark., 2016).

Böcekler üzerindeki olumsuz etkileri bilinen AZA'nın model deney hayvanı olan *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın bağışıklık sistemi ve hemositleri üzerindeki etkileri henüz araştırılmamıştır. Yaptığımız bu çalışma ile bu etkiler araştırılmış ve literatüre katkı sağlamıştır.

1.2. Azadirachtin'in Özellikleri ve Toksik Etkileri

Tarım sektöründe zararlılarla mücadelede pestisit kullanımı çok sık tercih edilen etkili bir yöntemdir. Fakat daha önce yapılan çalışmalar dikkate alındığı takdirde pestisitlerin kullanımı sadece kontrol altına alınmak istenen canlıları etkilemediği görülmektedir. Aynı zamanda uygulanan alandaki insanlar da dahil diğer canlılarda da önemli zarara sebep olmaktadır (Pimentel ve Levitan; 1986; Sak ve ark., 2006; Senthil-Nathan, 2013). Diğer bir deyişle sentetik insektisitler çevresel birçok zarara sebep olmaktadır ve bu durumun önüne geçmek için dünya çapında birçok çalışma yapılmaktadır, daha zararsız uygulamalar aranmaktadır. Bu süreçte biyolojik ajanların veya biyopestisitlerin kullanımı daha dikkat çekici bir hal almıştır. Özellikle biyopestisitler doğada bulunmaları, bitkilerde ve toprakta kalıntı bırakmamaları, ekonomik olmaları sebebiyle ön plana çıkmaktadır ve AZA bu konuda birçok soruna çözüm oluşturan bir biyoinsektisit maddesi olarak değerlendirilmektedir (Huang ve ark., 2004; Göçmen ve ark., 2007; Er ve ark., 2017).

AZA gibi bitkilerden elde edilen bitkisel insektisitler sentetik insektisitlerle kıyaslandığında doğada daha çabuk yok olurlar ve tarımsal ürünlerde, toprak ve suda daha az tortu bırakırlar. Doğada çözünmeleri sadece birkaç saat alan bitkisel insektisitler vardır (Senthil-Nathan, 2013). Yapılan araştırmalar sonucu böceklerin uygulanan kimyasal insektisitlere zamanla direnç mekanizması oluşturduğu, bunu gelecek döllere aktardığı ve bu sebeple uygulanan madde miktarının arttırıldığı bilinmektedir (Sak ve Uçkan, 2009; Sezer ve Ozalp, 2011). Dünya çapında kullanılan pestisitler incelendiğinde en yüksek kullanım payını herbisitler alır, %50'den fazladır. İnsektisit kullanımı %25 civarındadır ve fungusitler yaklaşık %15'lik bir pay alırlar (Pimentel ve Levitan, 1986).

Zararlı canlılarla mücadele ederken çevreye ve diğer canlılara verilen zararları en aza indirmek için "Birleşik Zararlı Yönetimi (Integrated Pest Management – IPM)" isimli uygulamaya geçilmiştir. Böylece zararlılara karşı uygulanan tüm yöntemler aynı anda değerlendirip en uygun olanı/olanları uygulanarak pestisitlerin ekolojik zararları en aza indirilmeye ve zararlıların en etkili şekilde kontrol altına alınması sağlanmaktadır (Sak ve Uçkan, 2009). Yapılan bilimsel araştırmalar sonucu bitkisel kökenli doğal insektisit kullanımının daha faydalı olacağı bilgisi elde edilmiştir. Bugün dünya pazarında doğal insektisitler henüz küçük bir oran elde ederken her geçen gün bu oran artmaktadır (Sezer

ve Ozalp, 2011).

AZA Hindistan Neem ağacı *Azadirachta indica* A. Jussieu (Meliaceae) tohumlarından ve Chinaball ağacı *Melia azedarach* (L.) (Rharrabe ve ark., 2008) meyvelerinden (Şekil 1.1) elde edildiği bilinen ve özellikle insektisitler içinde etki alanı geniş bir maddedir. Yaklaşık 4000 yıldır bilinen ağacın insektisidal etkileri 30 yıldır çalışılmaktadır (Sayah ve ark., 1996; Göçmen ve ark., 2007). İlk defa Butterworth ve Morgan (1968) tarafından izole edilmiştir ve insektisidal etkileri incelemeye başlanmıştır. AZA bir tetranortriterpenoid (limonoid)'dir (Beckage ve ark., 1988; Dorn ve ark., 1986) ve özellikle *A. indica* AZA elde etmek için en önemli Meliaceae üyesidir. Bilimsel çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre limonoidler yüksek oksijen içeren ve insektisidal etki gösteren terpenoid içeren bitkisel kimyasallardır. İnsektisidal etkilerin yanında antibakteriyal, antifungal, antikanser etkileri gösterdiği de gözlemlenmiştir (Charbonneau ve ark. 2007; Senthil-Nathan, 2013). *A. indica* özellikle Afrika olmak üzere birçok alanda yetiştirilebildiği için genetik çeşitliliği oldukça yüksektir ve bu sebepten etkili ve dayanıklı tohumlar elde edilebilir (Isman ve ark, 1990; Murthy ve Saxena, 1998).

A. indica'nın sistematikteki yeri şöyledir (De Jussieu, 1830);

Sınıf : Rutales

Alt Sınıf : Rutinae

Familiya : Meliaceae

Alt Familiya : Melioideae

Takım : Melieae

Cins : *Azadirachta*

Tür : *A. indica*

Neem ağacından elde edilen AZA'nın moleküler yapısı (Şekil 1.2) incelendiğinde yedi stereoizomeri olduğu gözlenir. Bunlardan ikisi oldukça bol bulunurken diğer beşi daha seyrek bulunur. Hepsinin büyüme ve gelişmede inhibe edici etkisi bulunmaktadır (Williams ve Mansingh, 1996).

Böceklerde AZA'ya karşı savunma mekanizması çok gelişmemiş olduğundan

dolayı böceklerde özellikle beslenmeyi inhibe edici etkisi (Butterworth ve Morgan, 1971; Girish ve Shankara Bhat, 2008) ile büyüme ve gelişmeyi engelleme etkisi gözlenir (Beckage ve ark., 1988; Sayah ve ark., 1996; Rharrabe ve ark, 2008; Raj, 2014; Er ve ark., 2017). Böceklerde beslenmeyi durdurma etkisini en fazla gösteren maddenin AZA olduğu söylenebilir (Malczewska ve ark. 1988). Bunlar dışında hormon sistemine zarar vererek (Malczewska ve ark. 1988) larva ve pup evrelerinde duraksama, pup evresine geçişi durdurma, üremede isteksizlik, kısırlaştırma, doğurganlığı azaltmak, protein ve lipid metabolizmasını bozmak (Williams ve Mansingh, 1996) gibi fizyolojik etkileri vardır. Böcekler dışındaki bazı organizmalara karşı da olumsuz etkilere sahip olmasına rağmen bir insektisit olarak AZA insan ve diğer sıcak kanlı canlılar için zararsız özelliktedir (Murthy ve Saxena, 1998; Huang ve ark. 2004; Charbonneau ve ark., 2007; Rharrabe ve ark, 2008; Lai ve ark., 2014; Er ve ark. 2017).

AZA böceklerde sinir sisteminde, hormon sisteminde, boşaltım sisteminde ve kas sisteminde negatif etki oluşturarak böceklerde ölüme sebebiyet vermektedir (Raj, 2014). AZA'nın böcek yumurtalarında vitellus oluşumunu da olumsuz yönde etkilediği de bilinmektedir (Sayah ve ark., 1996). Yapılan çalışmalarda AZA'nın ağız yoluyla böceğe uygulanması sonucu deri değiştirme ve puplaşma dönemlerinde enjekte etme yöntemiyle kıyaslandığında daha az etkili olduğu gözlenmiştir (Gelbic ve Nemec, 2001).

AZA bazı bireylerde reseptörlerin işlevini yerine getirememesine sebep olarak besin alımını engellemektedir. Büyümeyi yavaşlatma ve durdurma etkilerinin ise nasıl ortaya çıktığı hücresel düzeyde henüz çok fazla bilinmemektedir (Huang ve ark., 2004). Son dönemde yapılan çalışmalara göre+ AZA böceklerde hücre döngüsünü yavaşlatarak ve apoptoz mekanizmasını tetikleyerek hücre büyümesinde rol oynamaktadır. Yine de AZA'nın bağışıklık sisteminde ne gibi değişikliklere sebep olduğuyla ilgili çok fazla bilgi sahibi olunamamıştır (Er ve ark., 2017).



(A)



(B)

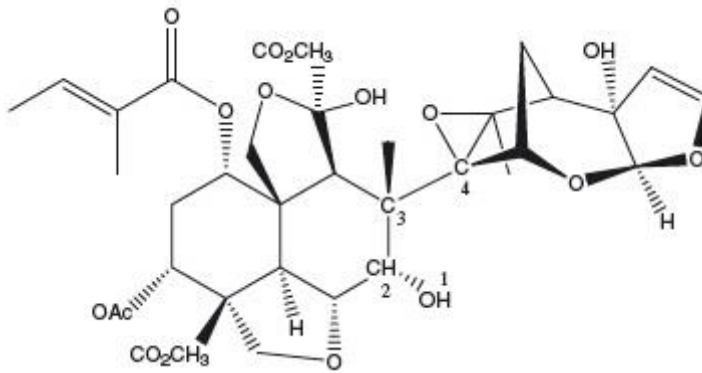


(C)



(D)

Şekil 1.1. *A. indica*'nın ürünleri (A) yaprakları, (B) meyveleri, (C) endokarplı tohumları, (D) endokarpsız tohumları (Girish ve Shankara Bhat, 2008)



Şekil 1.2. AZA'nın moleküler yapısı (Charbonneau ve ark., 2007)

1.3. Azadirachtin ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Tüm dünyaya yayılmış olan *Plodia interpunctella* türüyle çalışan Rharrabe ve ark. (2008) bu türün larvalarının AZA muamelesi sonrası lipit, protein ve glikojen miktarlarındaki değişimini ve α -amilaz enziminin etkinliğini incelediler. 2 ve 4 ppm dozlarında çalışılan böceklerde kilo kaybının oldukça yüksek olduğu not edilmiştir. Larva ve puplarda ölüme neden olan AZA; lipit, protein ve glikojen oranlarında da azaltıcı etki göstermiştir. Aynı zamanda enzim aktivitesinde de azalmaya sebep olmuştur.

Dere ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada AZA'nın *G. mellonella*'nın biyolojisine ve biyokimyasal parametrelerine etkisini incelemiştir. Çalışma kapsamında AZA'nın *G. mellonella* larvaları üzerinde toksik etki gösterdiği ve LD₅₀ değerinin 2.172 µg/larva olduğu bulunmuştur. AZA'nın pupal evrede de toksik etki gösterdiğini kaydeden Dere ve ark., bu evrede LD₅₀ değerinin 1.296 µg/larva olduğunu kaydetmiştir. Çalışmada AZA'nın larval yaşam süresini uzattığı ve pup evresine geçişi yavaşlatığı belirtilmiştir. 5 µg/larva dozunda larvalar uzun süre larval evrede kalarak pup evresine geçmeden ölmüştür. Pupal yaşam süresinde doza bağlı olarak bir farklılık yok iken ergin yaşam süresinde doza bağlı olarak azalma gözlenmiştir. AZA pup ağırlıklarında azalma ortaya çıkmıştır. Ergin ağırlıklarında LD₅₀ değeri ve ona en yakın olan 1.5 µg/larva dozu azalmaya sebep olmuştur. LD₅₀ değeri üzerindeki dozlarda ergin yaşamı gözlenmemiştir. Aynı çalışma kapsamında tayin edilen total protein miktarı verileri değerlendirildiğinde AZA'nın total protein miktarını arttırdığı kaydedilmiştir. AZA 0.5, 2.0 ve 3.0 µg/larva dozlarında malondialdehit miktarında artışa neden olmuştur. Antioksidan enzimlerin katalaz ve süperoksit dismutaz aktifelerinde AZA dozuna bağlı olarak azalış, glutatyon S-transferaz aktivesinde ise artış ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak AZA'nın *G. mellonella* larvalarında homeostazinin düzenlenmesinden deri değiştirmeye kadar birçok fizyolojik olayda toksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Lai ve ark. 2014 yılında DGE (digital gene expression) teknolojisi ile *Drosophila* larvalarının gen ekspresyonu üzerinde AZA'nın etkilerini ölçmüşlerdir. 5, 10, 20 µM AZA ile muamele edilen böceklerin gen ekspresyonunda farklılık olduğu gözlenmiştir. Ayrıca böcek larvalarında 16 ve 30 saat' lik uygulamalarda pupa geçme süresinde kısalma gözlenmiştir. Bunun dışında 20 µM uygulanan bireylerin bazılarında deri değiştirmesi esnasında bazı olumsuz etkiler de gözlenmiştir.

AZA'nın *G. mellonella* larvalarının gelişimlerini sağlayabilmek için gerçekleştirdikleri deri değiştirme olayını engellediğini belirten Malczewska ve ark. (1988) bunun tek etki olmadığını, aynı zamanda ekdizon hormonun da etkilendiğini belirtmişlerdir.

Charbonneau ve ark. (2007), *G. mellonella* larvalarında AZA etkilerine bakmışlardır. İlk deney grubu, 0,20 mg/g AZA uygulanan gruptaki bireyler kontrol grubu ile kıyaslandığında ölüm oranında istatistiksel açıdan bir değişiklik gözlenmemiştir, pupa geçme ve pup evresinin süresinin arttığı kaydedilmiştir. Ayrıca ergin bireylerde kısa kanat oluşumu şeklinde morfolojik bozukluklar açığa çıkmıştır. Diğer deney grubuna 4 µg/g AZA uygulanmıştır ve deney, gruptaki tüm bireylerin ölümü ile sonuçlanmıştır. Larval evrenin normalden uzun olduğu ve giderek siyahlaşarak sonunda ölümün gerçekleştiği not edilmiştir.

AZA'nın *Spodoptera litura* (F.)'da protein ekspresyonuna olan etkileri ölçülmüştür. Larva, pup ve ergin bireyler üzerinde çalışılmış olup 10 proteinin ciddi ölçüde AZA uygulanmasından etkilendiği kaydedilmiştir. Bu proteinlerin altısı hücresel etkileri olduğu için görece daha önemli proteinlerdir. Deri değiştirmede görev alan ekdizon hormonunun (Ishimo ve Kitamoto, 2010) reseptörü görevi gören protein de bir başka etkilenen proteindir. Dişi bireylerin AZA'ya daha fazla tepki gösterdiği belirlenmiştir (Huang ve ark, 2004).

AZA'nın *Labidura riparia* yumurtaları üzerindeki etkilerini inceleyen biliminsanları yaptıkları deney sonucunda AZA'nın yumurta gelişimini negatif yönde etkilediğini vurgulamışlardır. Etanol içerisinde 0,5 µg, 1 µg, 2 µg ve 3 µg AZA'yı çözdükten sonra her böceğe her dozda 1-6 µg miktarında uygulama yapılmıştır. İncelenen yumurtalıklarda ve foliküllerde bozulmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Folikül ağırlığında ve uzunluğunda da azalma meydana gelmiştir (Sayah ve ark., 1996).

Sezer ve Ozalp (2011), AZA'nın *G. mellonella* larvalarının total glikojen miktarına etkilerini ölçmek amaçlı bir deney yapmışlardır. Deneyde 1,00, 2,00, 4,00, 6,00 mL/100 g konsantrasyonları kullanılmış ve elde edilen sonuca göre doz oranına bağlı olarak total glikojen miktarının azaldığını not etmişlerdir. En yüksek azalma 6,00 mL/100 g uygulanan grupta gerçekleşmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslama sonucu 1,00 mL/100 g AZA uygulanan grupta bir değişiklik gözlenmemiştir.

Margosan-O 3 mg/ml AZA içeren bir insektisit çeşididir. *Spodoptera littoralis* larvalarına uygulanan Margosan-O etkileri incelenerek yapılan çalışmada larval evrenin normalden daha uzun olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Margosan-O ergin birey oranında da azalmaya sebebiyet vermiştir. Ölüm oranını arttıran Margosan-O %0,1 oranında uygulandığı zaman; deney, tüm larvaların ölümüyle sonuçlanmıştır (Haubruge ve ark., 1994).

Er ve ark. (2017) çalışmalarında AZA'nın *G. mellonella* ergin bireylerinin ortaya çıkma sürelerine, ömür uzunluklarına ve üreme verimine etkilerini incelemiştir. Çalışmada 1, 5, 10, 50, 100 ppm dozları kullanılmıştır. Sonuçlara göre ergin bireyin ortaya çıkış süresi 100 ppm dozunda artış göstermiştir. Ömür uzunluğunda ise en fazla 1, 5, 10 ppm dozlarında etki gözlenmiş ve bu dozlarda ömür uzunluğu kısalmıştır. Bırakılan yumurtalar incelendiğinde 5 ppm doz uygulanan grubun en az yumurta bırakan grup olduğu gözlenmiştir. Bırakılan yumurtalarda da sağlık oranı en düşük grup yine 5 ppm doz uygulanan gruptur.

AZA'nın *Bemisia tabaci* yumurtalarındaki ve larval gelişim sürecindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yumurta açılımında herhangi bir etkiye sahip olmayan AZA, larval gelişim sürecinde ve ergin evreye ulaşma oranında olumsuz etkilere sahiptir. Doz arttıkça ergin evreye ulaşan birey sayısı azalmıştır. Birinci ve üçüncü dönem larvalardaki AZA etkileri de incelenen çalışmada her iki deney grubunda da uygulanan doz artışına bağlı olarak ölüm oranının arttığı tespit edilmiştir. Ergin bireylerin yumurta bırakma oranlarında ise istatistiki olarak AZA'ya bağlı bir fark bulunmamıştır (Göçmen ve ark., 2007).

Gelbic ve Nemec (2001) çalışmalarında metirapon, neem yağı ve AZA'nın hem *G. mellonella* hem de *S. littoralis* bireyleri üzerindeki etkileri incelemiştir. Elde edilen sonuçlarda AZA'nın doza bağlı olarak pup ağırlığını arttırdığı, pup evresini kısalttığı, hem larval evrede hem pup evresinde ölüm oranında önemli bir değişikliğe sebep olmadığı ve ergin bireyin bıraktığı yumurta sayısını azalttığı gözlenmektedir.

AZA'nın böcekler üzerindeki deri değişimine etkisini inceleyen biliminsanları %10'luk etanol içerisinde çözünmüş farklı dozlardaki (0,00098 µg'dan 16 µg'a kadar) AZA'yı 5. larval evredeki *Oncopeltus fasciatus* bireylerinin 1. ve 2. abdominal segmentleri arasından enjekte etmişlerdir. Uygulama sonrası düşük dozların uygulandığı

bireylerde bir sonraki deri değiştirme evresine gelmeden ölüm oranlarında artış gözlenmiştir. Orta dozların uygulandığı bireylerde deri değişimi öncesi ölüm oranı %100'e yakinken yüksek dozların uygulandığı bireylerin %100'ünde de deri değişimi öncesi ölüm gözlenmiştir (Dorn ve ark., 1986).

Beckage ve ark., 1988 yılında yayınladıkları makalede 10 µg dozunda AZA uygulanan *Manduca sexta* larvalarında normal pup biçimini gözlemleyememişlerdir. Ayrıca erken pup dönemlerinde ve pup evresinde ölümler kaydetmişlerdir. Diğer bir uygulama dozu olan 5 µg verilerinde ise yine gelişme ve pup evrelerinde bozukluklar ve ölüm artışları not edilmiştir.

1.4. Böceklerde Bağışıklık Sistemi ve Hemositler

Bilindiği üzere böcekler dünya üzerinde sayıca en fazla olan canlılardır. Bunun sebeplerinden bir tanesi mükemmel bir bağışıklık sistemine sahip olmalarıdır (Bergin ve ark., 2006). Sahip oldukları bağışıklık sistemi zamanla birtakım değişikliklere uğrayarak sürekli olarak gelişmiştir (Brodeur ve Vet, 1995). Açık dolaşım sistemine sahip olmaları da bağışıklık sistemlerinin kuvvetli olmasının bir etkenidir (Dubovskiy ve ark., 2016). Hemolenf (vücut sıvısı), hemosöl adlı vücut boşluğu içerisinde serbestçe dolaşır (Rosales, 2011). Böylece böcekler, zararlılara karşı hızlı yanıt verme avantajına sahip olurlar. Bu durum zararlının vücut içinde yayılma hızını arttırdığı için aynı zamanda da bir dezavantajdır (Dubovskiy ve ark., 2016). Hemolenfin besin taşıma, boşaltım artıklarını taşıma gibi görevleri de bulunurken solunumda bir görevi yoktur (Rosales, 2011). Bilimsel araştırmalarda memeli canlıların kullanımının değeri ekonomik olarak oldukça yüksektir. Buna ek olarak etik değerler de memeli canlı kullanımını uygun bulmamaktadır. Fakat böceklerin sahip oldukları antimikrobiyal savunma sistemi gibi karmaşık savunma sistemi, diğer omurgasızlara oranla memeli canlılarla daha fazla benzerlik gösterir. Bu sebeple bilimsel çalışmalarda memeli canlılardaki toksik etkileri öğrenmek için en benzer sonuçları veren böcekler kullanılmaktadır (Ramarao ve ark., 2012).

Böceklerin hayatta kalmaları için sadece bağışıklık sistemleri değil aynı zamanda fiziksel yapıları da gelişmiştir. Sahip oldukları sert kutikula tabakası sayesinde dışarıdan gelen tepkilere ilk yanıtı verirler. Kutikula karbonhidrat ve proteinden oluşan cansız bir yapıdır (Brey ve ark., 1993). Fiziksel savunmayı kutikula tabakasıyla sağırlarlar.

Böceklerde hem doğuştan gelen hem de zamanla kazanılan iki savunma sistemi bulunmaktadır (Marmaras ve Lampropoulou, 2009).

Bağıışıklık sistemiyle alakalı olarak oldukça fazla ilerleme kaydedilmesine rağmen savunma mekanizması tam olarak çözülebilmüş değildir. Böcek bir saldırıya maruz kaldığında hemositler birbirleriyle uyumlu şekilde yarayı iyileştirmek için bir araya gelirler fakat her hemositin farklı bir görevi vardır (Lackie, 1988). Mesodermal kökenli kök hücrelerden oluşan (Rosales, 2011) hemositler; hemolenfin pıhtılaşmasından zararlıları etkisizleştirmeye kadar birçok görev alırlar (Xylander, 2009). Bazı biliminsanları daha farklı sonuçlar elde ettiklerini iddia etmelerine rağmen genelde hemosit çeşitleri kendi içlerinde morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre beşe (Şekil 1.3) ayrılırlar (Dubovskiy ve ark., 2016) fakat her hemosit çeşidi her böcekte bulunmamaktadır (Rosales, 2011).

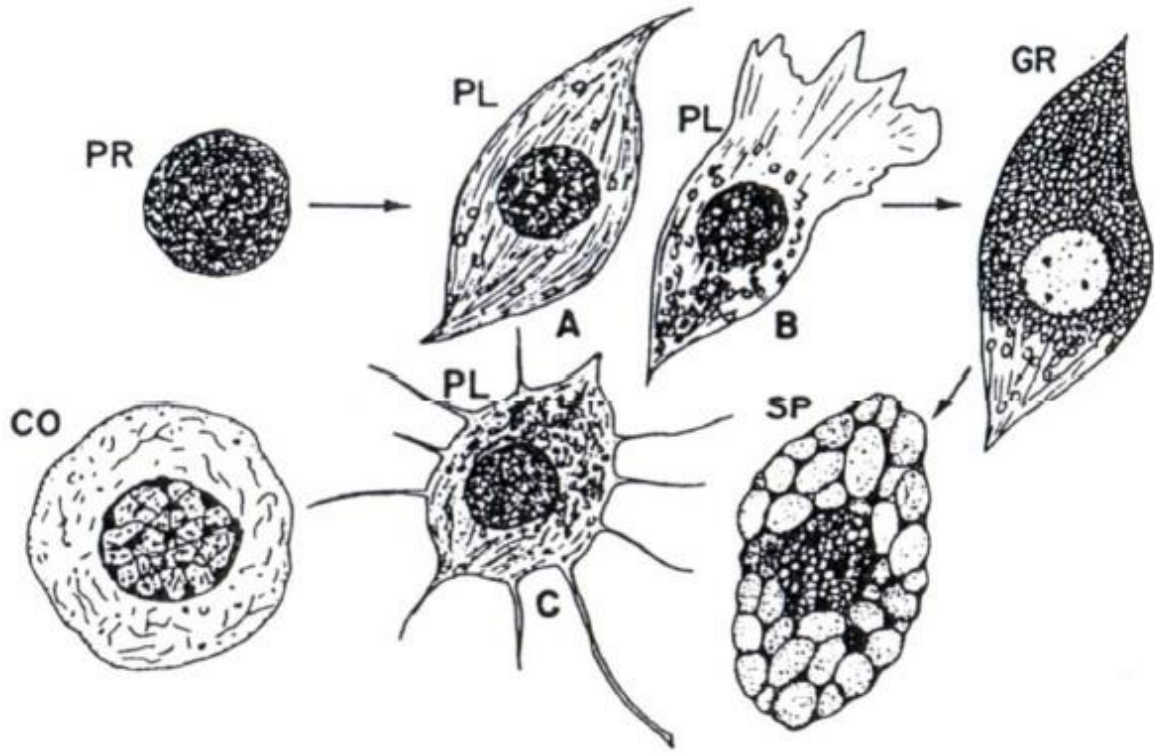
Prohemositler: Toplam hemosit miktarı ile değerlendirildiğinde %1-7 arasında bir oranda bulunurlar (Levin, 2007). Hemositlerin kök hücresi gibi değerlendirilen bu hemosit çeşidi genellikle böceklerin larval evrelerinde daha fazla bulunmaktadır. Oval şekilli ve 4-10 µm boyutlarında küçük hücrelerdir (Lackie, 1988; Levin, 2007). Sahip oldukları nukleusun neredeyse hücre boyutunda olması ile dikkat çekicidirler (Levin, 2007).

Plazmatositler: Tüm hücresel savunma mekanizmalarında görev alırlar. Lizozomal enzim içerirler (Lackie, 1988). Oldukça az sayıda granül içeren hatta bazen hiç granül içermeyen plazmatositler, mikroskopta 8-10 µm boyutlarında yuvarlak ya da iğ şeklinde uzamış olarak görünürler (Ribeiro ve Brehélin, 2006; Wu ve ark., 2016; Levin, 2007). Hemolenfte en fazla bulunan hemosit çeşididir (Levin, 2007). Tem mikroskobunda yapılan incelemelere göre pinositik vezikül ve vakuol bulundurmaktadır (Ribeiro ve Brehélin, 2006). Büyük bir nukleusa sahip olan plazmatositler (Wu ve ark., 2016) aynı zamanda çok sayıda endoplazmik retikulum ve mitokondriye de sahiptirler (Hall, 1983; Levin, 2007). Birçok biliminsanına göre temel görevlerinden biri enkapsülasyon mekanizmasında oluşturulan tabakanın kalınlaşıp sağlamlaşmasını sağlamaktır. Fagosit etme yeteneği konusunda ise biliminsanları arasında bir uzlaşma sağlanamamıştır (Ribeiro ve Brehélin, 2006). Yine de birçok bilim insanına göre tüm hücresel savunma mekanizmalarında görev almaktadır (Levin, 2007).

Granülositler: Yaklaşık 8-12 µm boyutlarında, yuvarlak şekilli hücrelerdir. Küçük sayılabilecek bir nükleusları vardır (Wu ve ark., 2016). Granülositlerin fonksiyonuna uygun şekilde gelişmiş endoplazmik retikulum yapısı bulunmaktadır. Lizozomlar ve serbest ribozomlar bol bulunurken mitokondri sayısındaki azlık göze çarpmaktadır (Levin, 2007). Fagosit etme yetenekleri gelişmiş olmasına rağmen fagosit edilemeyecek boyutlardaki zararlı maddelere karşı ilk tepkimeyi gerçekleştiren hücreler olmaları sebebiyle özellikle enkapsülasyon tepkimesi için oldukça önemlidirler (Ribeiro ve Brehélin, 2006; Levin 2007). Böcekler bir yaralanmaya ya da zararlıya karşı savunma yaparken granül içeriğini salarlar (Levin, 2007).

Sferositler: Pütürlü yapılarıyla tanınan sferositler 10- 15 µm boyutlarında oldukça büyük yuvarlak hücrelerdir. Sahip oldukları nükleusun küçük olduğu söylenebilir. İçerdikleri granül yapısı ise oldukça büyüktür (Wu ve ark., 2016). Hemolenf içersinde çok az miktarda bulunurlar (Hall, 1983). Hücresel boyutta incelendiklerinde ribozom, golgi aygıtı, mitokondri ve endoplazmik retikulum içerdikleri gözlenebilir (Levin, 2007).

Önositler: Diğer hemositlerle kıyaslandığında görece daha büyüklere, boyut olarak 25 µm'den büyük oldukları söylenebilir (Ribeiro ve Brehélin, 2006). Opak ve yanlardan basık şekilde bulunurlar (Hall, 1983). Boyutlarının büyüklüğüne rağmen nükleusları oldukça küçüktür (Wu ve ark., 2016). Hemolenf içersinde oldukça seyrek bulunurlar. Tam olarak görevleri bilinmemekle birlikte profenoloksidaz (proPO) içermeleri sebebiyle bağışıklık sistemine katkıları olduğu düşünülmektedir (Lackie, 1988). Hücre içersinde diğer organellerle kıyaslandığında ribozom sayısının fazlalığı göze çarpmaktadır. Diğer organeller ise çok gelişmiş değildir (Ribeiro ve Brehélin, 2006; Levin, 2007). İçerdikleri granül yapılarının boyutu ise küçüktür (Wu ve ark., 2016). Growth-blocking peptide (GBP) gibi büyüme-gelişmede etkili önemli proteinleri içeren hemositlerdir. Melanizasyonda, yaralanmalarda ve hücresel savunma tepkimelerinde gerekli ve etkili olan pro-PO içerdikleri de daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Levin, 2007).



Şekil 1.3. Böcek hemositlerinin görünüşleri. PR: Prohemosit, PL: Plazmatosit, GR: Granülosit, SP: Sferosit, CO: Önosit (Nation, 2002)

Böcekler mikrobiyal etkenlere karşı doğuştan sahip oldukları savunma sistemiyle yanıt verirler ve bu sistemin mekanizması insan ve memelilerdeki mekanizmayla ciddi oranda benzerdir (Nainu ve ark., 2015). Doğuştan sahip oldukları bağışıklık sistemi humoral ve hücresel bağışıklık sistemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Humoral bağışıklık sisteminde savunma yöntemlerinden birinde pıhtılaşmaya sebep olan proteinler sayesinde zararlı etkisizleştirilir. Diğer bir yöntem olarak antimikrobiyal peptit oluştururlar. Melaninleşme de bir humoral bağışıklık sistemi tepkimesidir (Vilmos ve Kurucz, 1998; Tunaz, 2004). Hücresel bağışıklık sistemi ise üç mekanizma şeklinde incelenir. Bunlar fagositoz, nodülasyon ve enkapsülasyondur (Levin, 2007; Wu ve ark., 2016; Er ve ark., 2017). Hücresel bağışıklık sistemiyle kıyaslandığında humoral bağışıklık sistemi daha yavaş gerçekleşir (Rosales, 2011).

Fagositoz görece küçük zararlılara karşı etkilidir. Enkapsülasyon ve nodülasyon ise büyük hacimli zararlılara karşı geliştirilen ve oldukça etkili olan yöntemlerdir (Xylander, 2009; Dubovskiy ve ark., 2016; Tunaz, 2004). Özellikle enkapsülasyon, oldukça büyük zararlıları etkisizleştirme için gösterilen en önemli tepkimedir (Hall, 1983;

Brodeur ve Vet, 1995; Choi ve ark., 2002). Fagositozun etkili olamadığı maddelerde enkapsülasyon tepkimesi hem aktif (zarar verme, yok etme) hem pasif (uzaklaştırma) şekilde görev alır. Enkapsülasyon tepkimesi hem zararlı maddenin şekil, büyüklük gibi morfolojik özelliklerine hem de konağın yaşı, boyutu, beslenme şekli gibi özelliklerine göre bireyden bireye farklıdır (Brodeur ve Vet, 1995). Parazitoit yumurtaları ve larvaları, protozoa ve nematod gibi zararlılara karşı fagositozun etkisiz kaldığı gözlenmekte ve bu gibi durumlarda enkapsülasyon yanıtının oluştuğu bilinmektedir. Bu zararlılara karşı oluşturulan yanıt bazı durumlarda nodülasyon şeklinde de isimlendirilir (Pech ve Strand, 1996; Choi ve ark., 2002; Fauvarque ve Williams, 2011).

Fagositoz, zararlı maddelere karşı geliştirilmiş yutarak etkisizleştirme yöntemidir (Lackie, 1988; Sideri ve ark., 2007). Zararlı maddenin boyutu böcek tarafından gösterilen savunma tepkisini belirlemekte temel sebeptir. Boyut olarak küçük maddelere karşı fagositoz mekanizması devreye girer. Buna rağmen madde küçük fakat sayı olarak fazla ise fagositoz yerine diğer savunma mekanizmaları devreye girer (Lackie, 1988). Fagositoz tepkimesi özellikle insan hücrelerinde daha çok araştırılmıştır. Bu sebeple fagositoz bilgisinin kaynağı insan hücre kültürleridir (Fauvarque ve Williams, 2011).

Fagositozun bazı biliminsanlarınca plazmatositler tarafından gerçekleştirildiği savunulur (Lackie, 1988; Richards ve Parkinson, 2000). İkincil olarak granülositlerin de fagosit etme yetenekleri vardır (Lackie, 1988). Birçok araştırmacıya göre ise plazmatosit ve granülositler fagositoz gerçekleştiren temel iki hemosit tipidir (Levin, 2007). Sindirilecek maddenin boyutu ortalama olarak 0,5 µm'den küçüktür. İlk ortaya çıkan hücresel savunma mekanizması olduğu düşünülen fagositozun evrimsel süreçte korunduğu da kanıtlanmıştır (Rosales, 2011).

Fagositoz yabancı maddenin tespiti ile başlar. Tanınan yabancı maddenin çevresinde oluşturulan yalancı ayaklarla maddeyi yutma eylemi gerçekleştirilir. Hücre içine alınan maddenin sindirilmesiyle sonlanır (Levin, 2007).

Bir canlı hem dışarıdan gelen zararlılara karşı hem de ölen hücre artıklarını sindirmek için fagositoz tepkimesi gösterir. Böylece canlı, yaşamının erken evrelerinde apoptoz sonucu oluşan vezikülleri sindirerek doku ve organ oluşumunu fagositoz ile düzenler (Rosales, 2011).

Nodülasyon küçük boyutlarda birçok zararlının aynı anda hemositler tarafından

çevrelenip bir çeşit tuzak içine alınması şeklinde gerçekleşen savunma tepkimesidir. Bakteri ve mantar gibi zararlıların konak canlıyla temasının kesilmesindeki en etkili, hızlı ve uygun tepkimedir. Yüksek miktardaki cansız maddelere karşı da nodül oluşumunu görmek mümkündür. Fagositozun gerçekleşemeyeceği boyutlardaki zararlı istilasında gösterilen bir tepkime olmakla birlikte boyut dışında zararlı sayısı da önemlidir. Çok sayıda zararlı nodülasyon tepkimesi sayesinde aynı anda etkisiz hale getirilebilir (Levin, 2007; Rosales, 2011; Dubovskiy ve ark., 2016). Enkapsülasyon ve nodülasyon birbirlerine çok benzeyen fakat bazı farklılıklar içeren tepkimeler oldukları için bazen ikisi için de enkapsülasyon terimi kullanılmaktadır (Dubovskiy ve ark., 2016).

Nodülasyon antimikrobiyal moleküllerle birlikte zararlıyla temastan çok kısa bir süre sonra zararlıyı çevrelemek suretiyle başlar. Bu tepkimenin başlamasına sebep bakteri, mantar, virüs, omurgalı eritrositleri, ksenogenik lökositleri, protozoon parazitleri ya da cansız zararlı nesneler olabilir. Nodülasyon zararlıyı kapana kısırmak olarak tanımlanabilir (Lackie, 1988). Nodülasyonda belli bir hemosit çeşidi değil tüm hemositler görev alırlar. Sürekli yeni hemositlerin katılımıyla nodül yapısı büyür. Enkapsülasyonda olduğu gibi bazı durumlarda melaninleşme de gözlenebilir. Eikosanoid hormonların nodülasyonda ciddi görevler aldığı birçok araştırmada ortaya çıkmıştır (Rosales, 2011). Nodülasyon tepkimesi 24 saat içinde gerçekleşip bitmiş olur (Levin, 2007).

Enkapsülasyon yabancı madde ile hemolenfin temas ettikten sonraki ilk birkaç dakika içinde başlayan bir tepkimedir. Konak ve zararlı türe göre enkapsülasyonun tamamlanma süresi 2 ila 24 saat arasında değişmektedir. Zamanla kapsül daha da belirgin olurken tamamlanması 72 saati bulabilir (Dubovskiy ve ark., 2016). Ortalama olarak dördüncü gün zararlı öldürülmüş, etkisiz hale getirilmiş olur (Hall, 1983).

Enkapsülasyon hemositlerin ortak bir tepkimesidir. Bu sebeple yayılan hemositler yani zararlıyla ilk temasa geçen granülositler içerdikleri granül yapılarını dışarı salarak (Ribeiro ve Brehélin, 2006) diğer hemositlerin içerdikleri proPO enzimini açığa çıkarmalarını sağlarlar (Dubovskiy ve ark., 2016). Granülositler ve plazmatositler daha önemli görevlere sahip oldukları için enkapsülasyon için birinci derece önemli hemositlerdir (Turnbull ve ark. 2004). Genelde tek başlarına enkapsülasyonda görev almazlar fakat granülositlerin bulunmama durumunda plazmatositler tek başlarına enkapsülasyonu başlatabilirler (Lavine ve Strand, 2001).

Tepkimeler hemositlerin yabancı maddeye teması ile başlar (Dubovskiy ve ark., 2016). Enkapsülasyon tamamlandığında hemositler birçok tabaka oluşturmuş olur (Lackie, 1988). Genelde ilk temasta bulunan granülositler (Pech ve Strand, 1996); plasmatositleri uyaran plasmatoocyte spreading peptide (PSP)'i ve içerdikleri granül yapısını salarak diğer hemositlerin tepkimeye katılmalarını sağlar (Lavine ve Strand, 2001) Daha sonra yayılıp yassılaştıran bu hemositlerin kümeleşmesinden sonra ise melanizasyon tepkimesi gözlenebilir. Fakat melanizasyon her enkapsülasyon tepkimesinde gözlenmeyebilir (Pech ve Strand, 1996; Fauvarque ve Williams, 2011). Enkapsülasyon ile hemositler tarafından zararlının canlıyla etkileşimi fiziksel olarak da engellenmektedir (Wani ve ark., 2017).

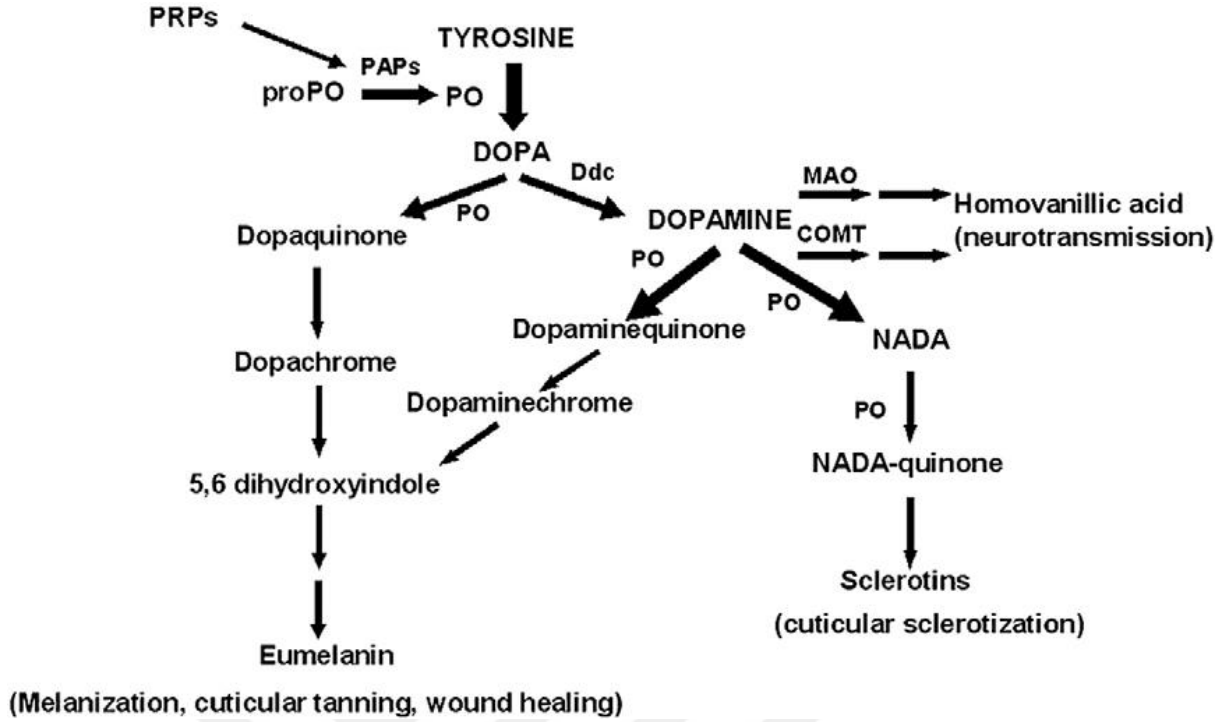
Enkapsüle etme işlemi esnasında humoral bağışıklık sistemi de yanıt oluşturarak daha kuvvetli, ortak bir savunma gerçekleştirilir. PRR (pattern-recognition receptors)'ler ile alınan ilk sinyalin ardından hemositler zararlının etrafına yapışmaya ve üzerinde yayılmaya başlarlar. Melanizasyon ile oluşturulan kapsülün daha dayanıklı olması sağlanır (Dubovskiy ve ark., 2016). Hücresel ve humoral bağışıklık sistemleri birbirlerini tetiklemesiyle mükemmel bir savunma gerçekleşir (Rosales, 2011).

ProPO humoral savunma sistemi olan melanizasyonun gerçekleşmesinde kullanılan enzimdir. Ayrıca hücrelerin zararlıya yapışmasında da görev alır. Bu şekilde zararlının etkinliği daha güçlü bir şekilde engellenmiş olur. Fenoloksidaz (PO) ise böceklerin hemolenf ve kütikularında inaktif şekilde mevcuttur. Genellikle zararlıyla ilk tepkimeye giren granülosit ve plasmatositlerin içerdikleri granül yapısını dışarı salmalarının ardından proPO ve kalsiyum iyonlarının salımı gözlenir. Granüllü hemositler proPO sentezinde en fazla görev alan hemosit çeşididir. Bazı reaktif oksijen (ROS) ve reaktif nitrojen (RNS) türlerinin melanizasyonda görev aldığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Dubovskiy ve ark., 2016).

Hücresel yanıtın en önemli aşamaları olarak hücrelerin zararlıya doğru yönelmesi, kapsülleşme, hemolenfin pıhtılaşması gibi ilk anda gerçekleşen olaylar sıralanabilir (Dubovskiy ve ark., 2016). Enkapsülasyonun gerçekleşme aşamaları ise şu şekilde (Lackie, 1988; Pech ve Strand, 1996; Wiegand ve ark., 2000; Lavine and Strand, 2001; Fauvarque ve Williams, 2011; Dubovskiy ve ark., 2016) sıralanabilir;

- Yabancı madde varlığı tespit edilir ve hemositlerle madde arasında bir iletişim kurulur
- Granülositler maddeyle ilk teması sağlarlar ve granül içeriğini salarak öncelikle plazmatositler olmak üzere tüm hemositler uyarılır ve hedefe doğru çağırılır
- Zararlıya yapışan granülositler yayılarak ilk yassı tabakayı oluştururlar,
- Diğer hemositlerin de katılımıyla çok katlı bir kapsül yapısı oluşturulur,
- Oluşturulan tabakalar arasında mevcut olan boşluk hücre içi yoğun bir materyalle doldurularak kapsül sağlamlaştırılır,
- İlk temasta bulunan granülositlerin parçalanmasından sonra ikinci bir granül tabaka oluşturulur ve enkapsülasyon tamamlanır,
- Oluşturulan kapsül melanize olabilir.

Melanizasyon, tirozinin dönüşerek siyah melanin pigmentinin oluşmasıyla sonuçlanan birçok reaksiyonun gerçekleşmesi ile meydana gelen bir yanıttır. Bu reaksiyonlarda özellikle PO (Şekil 1.4) olmak üzere birçok enzim rol oynar (Vilmos ve Kurucz, 1998; Nappi ve Ottaviani, 2000; Sideri ve ark., 2007; Marmaras ve Lampropoulou, 2009; Fauvarque ve Williams, 2011). Melaninleşmeye sebep olan PO salınımı hemositlerde gerçekleşir (Vilmos ve Kurucz, 1998) ve proPo içeriğinin yüksek olmasından dolayı önositler ön plandadırlar (Ribeiro ve Brehélin, 2006). Yara tedavisi, kanın pıhtılaşması, vücutta bulunan bir zararlının vücutla etkileşiminin kesilmesi gibi olaylarda melanizasyon gözlenir (Fauvarque ve Williams, 2011). Hemositlerle zararlıların temasından sonra PO, mikrobiyal peptidoglikan, bazı molekül ve enzimler sayesinde melaninleşme süreci başlamış olur (Rosales, 2011). Melanizasyonun tirozin metabolizmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Hücreler tarafından salınan PO ile etkilenen tirozin Dopa (dihydroxy-phenyl-alanine)'ya dönüşür. Dopa ise melanin pigmentinin oluşumuyla sonuçlanan kimyasal süreçlerden geçer (Marmaras ve Lampropoulou, 2009).



Şekil 1.4. Hemositlerdeki PO yolağıyla gerçekleşen tirozin metabolizması (Marmaras ve Lampropoulou, 2009)

Antimikrobiyal peptit oluşumu da omurgasızlardaki oldukça önemli olan bir başka humoral bağışıklık tepkimesidir. Antimikrobiyal peptitler böceklerde esas olarak fat body tarafından sentezlenir ve salınır (Nappi ve Ottaviani, 2000; Wojda ve Jakubowicz, 2007). Fakat ikincil olarak hemositler, bağırsak bezleri, tükürük bezleri, kutikular epitel hücreleri (Brey ve ark., 1993) ve üreme yapıları da antimikrobiyal peptit oluşumuna katılabilirler (Vilmos ve Kurucz, 1998). Antimikrobiyal proteinler oldukça küçük proteinlerdir ve bir tepkime esnasında bir araya gelerek cevap oluştururlar (Wojda ve ark., 2009). En önemli antimikrobiyal peptitler sekropinler ve attasinlerdir (Daffre ve ark., 1994). Gallerimisin, galiomisin, morisins ve gloverins de *G. mellonella*'da bulunan önemli antimikrobiyal peptitlerdendir (Wojda, 2016). Antimikrobiyal peptit oluşumuna başlanması için PRR'lar tarafından zararlının varlığına ilişkin sinyal alınır (Rosales, 2011). Yapılan araştırmalar sonucunda 150'den fazla antimikrobiyal peptit tespit edilmiştir (Levin, 2007). İçerdikleri amino asit sayısı genelde 15 ila 40 arasında değişmektedir (Boman ve ark., 1991). Lizozim böceklerde *G. mellonella*'dan elde edilerek tanımlanan ilk antibakteriyel faktördür ve böcek savunma sistemi için oldukça önemlidir ve oldukça erken tanımlanmıştır. Lizozim bakterilerdeki peptidoglikan

tabakasının β -(1,4)-glikosidik bağıını kopararak zarar veren bir enzim olarak çalışır (Daffre ve ark., 1994; Boman ve ark., 1991).

Hemolenfin pıhtılaşması ile ilgili elde edilen bilgilerin diğer eklem bacaklılarla kıyaslandığı zaman böcekler için oldukça azdır (Theopold ve ark., 2002). Hemolenfin pıhtılaşması ile ilgili yapılan çalışmalarda iki mekanizma bulunmuştur. Bunlardan biri *Leucophaea maderae* ve *Locusta migratoria* üzerinde çalışılmış diğeri ise *Lymulus polyphemus* türü üzerinde çalışılmıştır. İlk mekanizmada Ca^{2+} oranıyla ilişki olarak hemositlerin transglutaminaz salınımı sonucu pıhtılaşmaya sebep olan proteinler katalanizlenir. İkinci mekanizmada serin protein ailesinin aktivitesi sonucu pıhtılaşma gerçekleştiği gözlenmiştir (Vilmos ve Kurucz, 1998). Hücre pıhtılaşmasında başka bileşenlerle birlikte aktifleşen birçok hücresel ve humoral bileşen mevcuttur (Theopold ve ark., 2002).

1.5. Böceklerde Bağışıklık Sistemi ve Hemositler ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Brodeur ve Vet, 1995 yılında karşılaştırmalı bir çalışma yapmışlardır. Enkapsülasyon tepkimesinde parazitoit önemini incelemek için iki benzer tür olan *Cotesia rebucula* ve *C. glomerata* türleri ile çalışmışlardır. Çalışmada konak canlı olarak da *Pieris brassicae*, *P. rapae* ve *P. napi* türlerini kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre *C. glomerata* yumurtalarının tüm konak canlılar üzerinde yaşam oranları daha yüksek çıkmıştır. Konak canlıının yaşının da enkapsülasyon için oldukça etkili olduğu kaydedilmiştir.

Canlı (2017) yaptığı çalışmada 5 farklı dozda (100, 500, 1000, 2000, 3000 ppm) titanyum dioksit (TiO_2) nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarının hemositlerinde enkapsülasyon ve melanizasyon yanıtlarına etkileri incelemiştir. Elde edilen sonuçlara göre 4 saatlik enkapsülasyonda enkapsüle olmamış boncuk sayısında 1000 ppm dozunda artış ortaya çıkmıştır. Enkapsüle olmamış boncuk sayısında diğeri dozlarda ve zayıf enkapsüle olmuş boncuk sayısında bir farklılık olmazken güçlü enkapsülasyonda 3000 ppm dozunda önemli bir artış gözlenmiştir. 24 saatlik enkapsülasyon durumunda kontrol grubuyla deney grupları arasında bir farklılık kaydedilmemiştir. Aynı çalışma içerisinde incelenen 4 saatlik melanizasyon durumunda 500 ppm dozunda melanize olmamış boncuk sayısında azalma gözlenirken 5000 ppm dozunda önemli bir artış tespit edilmiştir. Zayıf melanizasyon durumunda 100, 1000 ve 5000 ppm dozlarının azalmaya sebep

olduğu belirtilmiştir. Orta ve güçlü melanizasyon durumlarında ise doza bağlı bir farklılık gözlenmemiştir. 24 saatlik melanizasyon durumunda melanize olmamış ve orta melanize olmuş boncuk sayılarında farklılık gözlenmeyen çalışmada zayıf melanize olmuş boncu sayılarında 3000 ppm dozunda önemli bir yükselme olmuştur. Güçlü melanizasyon durumunda ise 500, 1000 ve 2000 ppm dozlarında azalma olduğu kaydedilmiştir.

Gagen ve Ratcliffe (1976) *G. mellonella* ve *P. brassicae* larvalarına öldürülmüş ve canlı *Bacillus cereus* enjekte ettikten 5, 15, 30 ve 60 dakika sonra böceklerdeki hemosit miktarının değişimini ölmüşlerdir. Elde ettikleri veriye göre ilk 5 dakika için iki böcek türünde ve iki bakteri grubunda da en yüksek düşüş gözlenmiştir. Sonraki dakikalarda ise kontrol grubuyla kıyaslamada hemosit miktarının düşük olduğu tespit edilmiştir.

Parazitoit venomunun konak üzerindeki enkapsülasyon davranışına etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmada *Pimpla hypochondriaca* ergin dişilerinden elde edilen venom *Lacanobia oleracea* larvalarına uygulanmıştır. Kontrol grubuna sadece PBS enjekte edilmiş deney gruplarından birine 16 µg (2 µl) diğerine 32 µg (4 µl) venom enjekte edilmiştir. Uygulamadan iki saat sonra boncuklar enjekte edilmiştir. Çalışmada Sephadex A-25 kromatografi boncukları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 24 saat sonra kontrol grubundaki tüm boncuklar enkapsüle olurken 16 µg venom uygulanan grupta enkapsülasyon yeteneği yaklaşık olarak yarı yarıya düşmüştür. Son olarak 32 µg venom enjekte edilen grup neredeyse hiç enkapsülasyon yanıtı oluşturamamıştır (Richards ve Parkinson, 2000).

Yılmaz (2013) yüksek lisans çalışmasında 100.000, 200.000 ve 300.000 ppm dozlarında alüminyum klorürü besine ilave ederek larvalara uygulamıştır. Elde edilen sonuçlara göre alüminyum klorür hiçbir dozda *G. mellonella* larvalarının hemosit sayıları üzerinde bir değişikliğe sebep olmamıştır. Aynı çalışmada elde edilen diğer bulgulara göre alüminyum klorür *G. mellonella* larvalarının gelişim sürelerini kısaltmıştır. Larva, pup ve ergin ağırlıklarında bir farklılık yaratmayan alüminyum klorür erginleşme sürelerinde değişikliğe neden olmuştur. En yüksek doz olan 300.000 ppm'de erginleştirme süresini kısaltırken diğer dozlarda bu süreyi uzatmıştır. Ergin bireylerde ömür uzunluğu ise her üç dozda da azalmıştır.

Eskin (2017) çalışmasında gümüş ve çinko oksit nanopartiküllerinin *G. mellonella* hemositleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmada 100, 500, 1000, 3000 ve 5000

ppm dozları kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre çinko oksit nanopartiküllerinin 1000 ppm ve üzeri dozlarında hemosit sayısının azalttığı, gümüş nanopartiküllerinin ise 500 ppm ve üzeri dozlarda hemosit sayılarını azalttığı tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında enkapsülasyon ve melanizasyon tepkimelerini değerlendiren Eskin'in çalışmasının sonuçlarına göre gümüş nanopartikülleri 4 ve 24 saatlik enkapsülasyon davranışına etki etmez iken çinko oksit nanopartikülleri 4 saatlik enkapsülasyonda zayıf enkapsülasyonu artırır iken 24 saatlik enkapsülasyonda bir etki göstermemiştir. Gümüş nanopartikülleri 4 ve 24 saatlik melanizasyon davranışına etki etmemiştir. Çinko oksit nanopartikülleri 4 ve 24 saatlik melanizasyon davranışını artırıcı etkide bulunmuştur.

Er ve ark. (2017)'nin çalışması incelendiğinde *G. mellonella* bireylerine uygulanan AZA dozu arttıkça nodül oluşumunun azaldığı gözlenmiştir. Aynı şekilde mitotik hücreleri de etkileyen AZA, doz arttıkça mitozu engelleyici etki göstermiştir.

Wojda ve ark (2009) yaptığı çalışmada *G. mellonella* larvalarına *Beauveria Bassiana* blastosporları 3 farklı dozda enjekte etmiştir. Uygulamadan 24 saat sonra hemolenften aldıkları örnekler üzerinden humoral bağışıklık sistemi üzerindeki etkiyi inceleyen Wojda ve ark., antibakteriyel aktivitede en düşük doz ile kontrol grubu arasında bir fark gözlemlememişken diğer dozlarda önemli derecede artış olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada antifungal aktivite ve lizozom aktivitesi de incelenirken deney sonuçlarına göre iki tepkimede de doza bağlı olarak aktivite yükselişi kaydedilmiştir.

Wiesner ve Götz (1993) *G. mellonella* larvalarına silika boncuk enjekte edildikten sonra oluşan bağışıklık tepkimesi üzerine yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçlara göre larvalarda boncuklara karşı kuvvetli bir hücrel cevap ortaya çıktığı ve granüler hücrelerin boncuklarla temasa geçtiğini kaydetmişlerdir. Boncuklarla granüler hücreler salınan yapışkan granüler yapı ile birbiriyle yapışmıştır. Plazmositlerin de fagositoz ile bir cevap oluşturduğu not edilmiştir. Bir hücrenin altı boncuğu fagosite ettiği gözlenmiştir. Hemositler hidrofobik boncuklara karşı herhangi bir tepkime göstermemişlerdir. Bu boncuklar hemosöl içerisinde küçük yağ damlacıkları bırakarak serbest şekilde kalmışlardır. Bırakılan damlacıklarla hemositler arasında da bir tepkime oluşmamıştır.

Altuntaş (2011) çalışmasında 6 farklı GA₃ dozu kullanmışlardır. GA₃ yapay

besine ilave edilerek *G. mellonella* larvalarının hemositleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Larvalarda toplam hemosit sayısında doza bağlı olarak değişiklik meydana getirdiği saptanmıştır. GA₃'in hemosit tiplerinde ise bir farklılık göstermediği kaydedilmiştir.

Sak (2004)'ın çalışmasında bir insektisit çeşidi olan cypermethrin kullanılmıştır. Su yerine farklı dozlarda cypermethrin ilave edilerek hazırlanan besinlerle beslenen böcekler üzerinde yapılan incelemeler sonucunda *P. turionellae* hemositlerindeki mitotik aktivitenin cypermethrin uygulaması sonucu azaldığı kaydedilmiştir.

1.6. Böcek Hemositlerinde Apoptoz Mekanizması

Çok hücreli organizmalarda canlılığı sürdürebilmek için hücre bölünmeleri ile hücre ölümleri belli bir dengede tutulmaktadır (Bröker ve ark., 2005). Apoptoz canlı için gerekli olmayan veya belli bir sebepten ötürü görevini yerine getiremeyen hücrelerin ya da yaralanmış hücrelerin diğer doku ve hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılması olayıdır (Qiang ve ark., 2005). Yetişkinlerde homeostazinin korunması ve embriyonik evrede organ oluşumu apoptoz ile düzenlenir (Menze ve ark., 2010; Darakhshan ve Ghanbari, 2013). Apoptoz programlanmış fizyolojik bir süreçtir ve Yunanca düşmek anlamına gelen kelimelerden türetilip yaprak dökümüne benzetilir (Güleş ve Eren, 2008).

Apoptoz başlaması için gerekli olan sinyalin geldiği yere göre dış yolak ve iç yolak olmak üzere iki apoptoz yolağı vardır. Hücre dışından gelen sinyalin membranda bulunan reseptörelere bağlanıp sinyali hücre içine ilemesiyle başlayan yolak dış yolaktır. Hücre içinden mitokondrilerden gelen bir sinyal ile başlayan yolak ise iç yolaktır. Mitokondriler her iki yolak için de oldukça önemi bulunan organellerdir. Dış yolak hücre gelişimleri ile ilgili durumlarda aktif olan bir yolakken bir stres faktörü varlığında iç yolak aktif olur (Bröker ve ark., 2005; Menze ve ark., 2010). Bu iki yolakta da apoptoz sürecinde kaspaz proteinleri görev almaktadır ve kaspaz bağımlı hücre ölümü şeklinde de isimlendirilmektedir. Bazı durumlarda ise apoptoz sürecini başka proteinler yöneterek kaspaz bağımsız hücre ölümü adını alır (Constantinou ve ark. 2009). Kaspazlar proteinleri aspartik asitlerinden kesen ve sistein içeren proteaz ailesidir (Menze ve ark., 2010). Apoptoz esnasında ilk önce kaspaz-3 etkinleşir (Takaki ve ark., 2013).

Apotoz ve nekroz hücrenin iki farklı ölüm biçimi şeklinde tanımlanmıştır.

Apoptoz daha kontrollü ve düzenli bir biçimken nekroz hücre kontrolü dışındadır. Apoptozda hücre kendi ölümünü yönetir fakat nekroz hücre dışında oluşan bir olumsuzluktan dolayı aniden ortaya çıkan ölüm yoludur. Diğer bir deyişle apoptozda canlı homeostazisini ve doku gelişimini sağlamak için hücrenin kendi kendisinin yönettiği bir süreçken nekroz beklenmedik bir zamanda ve şiddetli bir yaralanma sonucu ortaya çıkan bir süreçtir (Formigli ve ark., 2000; Bröker ve ark., 2005).

Apoptozda hücre büzülerek küçülür, kromozomlarda yoğunlaşma gözlenir (Takaki ve ark., 2013), membranda tomurcuklanmalar ortaya çıkar, membranin hücre içine bakan yüzeyinde bulunan fosfotidilserinler diğer yüzeye geçerler ve apoptotik cisimler oluşturularak parçalanan hücre diğer doku ve hücrelere zarar vermez. Oluşan bu apoptotik cisimler diğer hücreler tarafından fagosite edilirler ve apoptozda inflamasyon (Darakhshan ve Ghanbari, 2013) gözlenmez. Nekrozda ise hücre şişer ve patlar, membran bütünlüğü korunamaz, hücre içeriği salınarak diğer doku ve hücrelere zarar verir (Constantinou ve ark., 2009).

Apoptozun hücre içi düzenlemesinde görev alan önemli protein ailelerinden biri de Bcl-2 ailesidir. Bax ve Bak gibi bazı üyeleri mitokondrinin geçirgenliğini arttırarak sitokrom c salınımını tetikleyerek apoptozu indüklerken Bcl-2 ve Bcl-X_L gibi üyeleri de aksine geçirgenliği azaltarak apoptozun başlamasını engellerler (Green ve Reed, 1998; Bröker ve ark., 2005).

Son zamanlardaki gelişmelerle birlikte ağır metaller apoptoza sebep olan önemli maddeler haline gelmiştir (Qiang ve ark., 2005). Ayrıca yapılan çalışmalarda oksidatif stres, toksik uyarılar gibi etkenlerin ya da kanser gibi hastalıkların apoptozun başlamasına sebep olduğu öğrenilmiştir (Formigli ve ark., 2000).

Mikronukleus hücre bölünmesinin anafaz evresinde esnasında serbest kalan kromozom fragmentinin varlığını devam ettirmesi ile oluşan nükleer yapılardır. Mikronukleus yapıları mutajenik, klatojenik ve karsinojenik ajanlar tarafından ortaya çıkan DNA hasarından kaynaklı oluşur. İlk olarak Howell tarafından saptanmıştır. Oluşumu Jolly tarafından ise tam şekilde ortaya konduğu için Howell-Jolly cisimciği de denilmektedir (Üstüner, 2011).

Bir hücrenin siklus hızının ve sıklığının yani organizmanın büyümesinin ve gelişmesinin ölçülmesi mitotik indeks ile belirlenir (Öcal, 2012). Bir sitotoksik ölçüt olan

mitotik indeks yaşıyan tüm hücreler için kabul edilebilirdir. Hücresel zarar veren maddeler bölünme esnasında mikrotübül oluşumunu engelleyerek hücre bölünmesini etkilerler. Bir organizmada mitotik indeksin yarı yarıya azalması ölümle sonuçlanır (Fındıklı ve Türkoğlu, 2010).

1.7. Böcek Hemositlerinde Apoptozla İlgili Yapılan Çalışmalar

G. mellonella'nın doğal düşmanı olan *P. turionellae* dişileri, yumurtalarını konak canlı olan *G. mellonella*'ya bırakırken yumurta gelişimini engellememesi için konak bağışıklık sistemini engelleyen bir zehir de enjekte ederler. Bu zehrin konak canlıdaki apoptotik etkisine bakan Er ve ark. (2011), zehir uygulamasından 4, 8 ve 24 saat sonra *G. mellonella* puplarında apoptotik indeks değişimine bakmışlardır ve 0,01 VRE (Venom Reservoir Equivalent) uygulanan grupta 24 saatlik deneyde ve 0,02 VRE uygulanan grupta 4, 8 ve 24 saatlik deneylerde geç apoptoz artışı olduğunu gözlemlemişlerdir. Nekroz hücrelerini değerlendirdiklerinde ise en yüksek orana 0,05 VRE uygulanan grubun sahip olduğunu not etmişlerdir.

Meena ve ark., 2015 yılında beyin üzerinde yaptıkları bir çalışmada TiO_2 nanopartikülünün Bax, Bcl-2, p53 ve sitokrom c proteinlerini etkileyerek apoptoz artışına neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

TiO_2 nanopartikülünün *G. mellonella* larva hemositlerinde apoptotik indekse etkilerinin incelendiği çalışmada elde edilen sonuçlara göre; 5 farklı dozda uygulanan TiO_2 nanopartikülünün larvalarda canlı hücre sayısının azaldığı yani apoptozun tetiklendiği belirtilmiştir. Erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz durumlarında da kontrol gruplarıyla kıyaslandığında artış gözlenmiştir. Aynı çalışmada elde edilen mitotik indeks verilerine göre TiO_2 nanopartikülü *G. mellonella* larva hemositlerinde mitozu engelleyici etki göstermiştir. Mikronukleus oluşumunda doza bağlı farklılıklar gösterildiği kaydedilen çalışmada TiO_2 nanopartikülünün tahmin edilenin aksine düşük dozlarda daha etkili olduğu belirtilmiştir. Yüksek dozlarda kümelenme eğiliminin yüksek olması nanopartikülün etkisini azaltmıştır (Canlı, 2017).

Eskin (2017) çalışmasında 100, 1000, 3000 ve 5000 ppm dozlarında gümüş nanopartikülü apoptoz tepkimesinde artışa sebep olmuştur. Gümüş nanopartikülü mitotik indekse etki etmezken mikronukleus oluşumunda artışa sebep olmuştur. Çinko oksit

nanopartikülü ise apoptoz tepkimesinde ve mitotik indekste herhangi bir etkiye sebep olmazken mikronukleus oluşumunda artışa sebep olmuştur.

Qiang ve ark. 2005 yılında *S. litura* ile çalışmış ve çinko etkisine bakmışlardır. Çalışmada 50, 100, 150, 500 ve 1000 mg·kg⁻¹ dozlarında çinko kullanmışlar ve elde ettikleri sonuçlarda sadece 1000 mg·kg⁻¹ dozunda ölüm ve apoptoz oranının arttığını tespit etmişlerdir. Diğer dozlarda istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir.

TiO₂ nanopartikülleriyle yapılan çalışmada 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, ve 0.8 mg/ml nanopartikül uygulanan örneklerde yaşam oranının düştüğü kaydedilmiştir. Aynı çalışmada TiO₂ nanopartiküllerinin uygulamadan 12 saat sonra nukleus yoğunlaşmasını arttırıcı etkisi olduğu belirtilmiştir. Apoptozla ilişkisi bilinen kaspaz-3 aktivitesinin de etkisinin incelendiği çalışmada uygulama sonrasındaki 24 saatte kaspaz-3'ün kontrol grubuyla kıyasla etkinliğinin 3 kat arttığı gözlenmiştir (Takaki ve ark., 2013).

GA₃'in böcekler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada yapılan mitotik indeks ölçümlerine göre hazırlanan dozlar arasında en yüksek doz olarak uygulanan 5000 ppm dozunda kontrol ve diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenmiştir. Apoptoz çalışmasında ise GA₃ dozlarına bağlı olarak *G. mellonella* larvalarında canlı hücre sayısında azalma, geç apoptoz ve nekroz oluşumunda artış gözlenirken erken apoptozda dozlarla kontrol grubu arasında bir değişiklik gözlenmemiştir (Altuntaş, 2011).

Spodoptera frugiperda hücrelerinde ipekböceği hemolenfinin etkisini inceleyen biliminsanları, %10 FBS içerisinde üretilen hücrelerde aktinomisin D ilavesinden 6 saat sonra DNA (deoksiribonükleik asit) fragmentasyonu gözlemeye başlamıştır. %5 FBS ve %5 ipekböceği hemolenfi içerisinde üretilen hücrelerde düşük miktarda DNA fragmentasyonunun gözlenmesi için 13 saat geçmiştir. Kontrol gruplarında DNA fragmentasyonunun çok daha kısa sürede ortaya çıktığı gözlenmiştir. Aktinomisin D yerine kamptotesin ve staurosporin ile yapılan çalışmalarda da elde edilen sonuçlar benzerdir. Çalışma sonucunda çeşitli kimyasallarla ipekböceği hemolenfinin *S. frugiperda* hücrelerinde apoptozu inhibe ettiği kaydedilmiştir (Rhee ve ark., 2002).

Nainu ve ark (2015) *Drosophila melanogaster* hücrelerinde *Drosophila C* virüsünün apoptoz etkisini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre virüs, *D. melanogaster* bireylerinde apoptoz artışına sebep olmaktadır.

Cypermethrinin *P. turionellae* hemositleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada elde edilen apoptotik indeks sonuçlarına göre ise apoptoz tepkimesinin doza bağlı olarak artış gösterdiği oldukça net şekilde gözlemlenmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman cypermethrinin hemositlerde mikronukleus oluşumunu tetiklediği belirtilmiştir (Sak, 2004).

1.8. *Galleria mellonella* L. 1758 (Büyük Balmumu Güvesi)'nin Biyolojisi

Model organizma olarak kullanılan *G. mellonella* yumurta, pup, larva ve ergin (Şekil 1.7) şeklinde bir yaşam döngüsüne sahiptir (Smith, 1965; Akyol, 2013). Ortalama yaşam sıcaklığı 26 ± 2 °C olmasına rağmen 4 °C'den 37 °C'ye kadar çeşitli sıcaklıklarda yaşayabilirler (Akyol ve ark, 2009; Wu ve ark., 2016). Kültürünün yapılmasının verdiği kolaylık, ucuzluk ve hızlilik sebebiyle *G. mellonella* model organizma olarak değerlendirilip günümüze kadar birçok çalışmada kullanılmıştır (Altınçiçek ve ark., 2007; Er ve ark. 2017). Ayrıca 37 °C'de dahi yaşamını sürdürebilmesi mikroorganizma çalışmaları gibi birçok çalışmada kullanılmasının önünü açmaktadır (Junqueira, 2012).

G. mellonella'nın sistematikteki yeri şu şekildedir;

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Lepidoptera

Üstfamilya: Pyraloidea

Familya: Pyralidae

Altfamilya: Galleriinae

Cins: *Galleria Fabricius*, 1798

Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)

Genellikle kümeler şeklinde çatlaklar içine bırakılan yumurtalar ortalama 0,04 cm çapında ve kemiksi beyaz bir renktedirler (Smith, 1965; Charrière ve Imdorf, 1997; Akyol, 2013). Ama gelişim evresinde koyulaşarak önce sarıya yakın bir renge daha sonra pembemsi bir tona sahip olurlar. Larva çıkışından sonra ise şeffaf bir görünüm alırlar

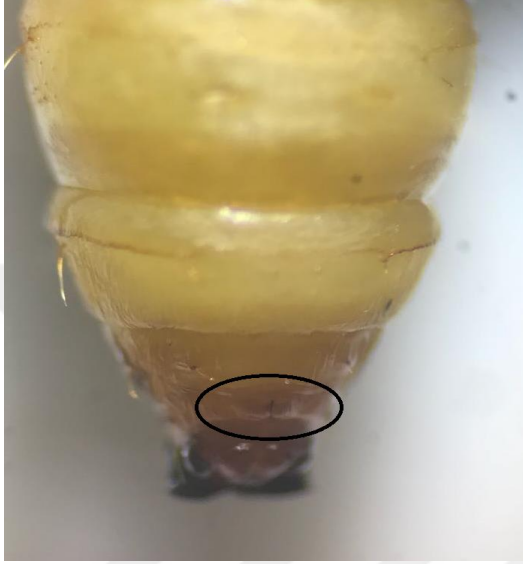
(Özer, 1961; Akyol, 2013). Yaklaşık 0.4- 0.5 mm çapında olan yumurtalar (Charrière ve Imdorf, 1997; Özer, 1961) küre şeklindedirler ve dış yüzeylerinde genellikle altıgen şeklinde desenler bulunmaktadır. Katı yapıda olmadıkları için yan yana bırakıldıkları yumurtalar tarafından sıkıştırılıp düze yakın bir görünüm de alabilirler (Smith, 1965). Ortalama olarak 7 günde açılan yumurtalar için optimum sıcaklık 25 °C'dir (Sezer ve Ozalp, 2011). Açılan yumurtalar 10 °C'ye kadar yavaş da olsa gelişimlerini sürdürebilirken ve bu sıcaklığın altında larva çıkışı gözlenmez (Akyol, 2013).

Yumurtadan ilk çıktıklarında açık sarı renkte olan larvalar gelişimleri boyunca giderek daha koyu bir renk alırlar. Toraks bölgesinde 3 çift gerçek ayak mevcuttur. Bunlar dışında abdomende 5 çift ayak vardır. Bunlardan dördü çelenk tipi yalancı ayakken bir çifti yarı çelenk tipi yalancı ayaktır (Özer, 1961). Larval evrenin ilk anından ergin hale dönünceye kadar metamorfoz geçirir. Sekiz veya dokuz larval evre geçiren *G. mellonella* sadece bu evrede beslendiği için çevresel zararları da bu evrede vermektedir (Smith, 1965). Arı petekleri, mum ve bal ile beslenerek verdikleri çok ciddi ekonomik zararlar ile ilgi çekmektedir. Petekler içinde tüneller açmak suretiyle petekleri kullanılmaz hale getirmektedirler (Büyükgüzel ve Kalender, 2009; Akyol ve ark., 2009). Arıcılık sektörüne verdiği zararlardan en büyüğü arı peteklerinde yarattığı tahribattır. Petek duvarları arası oyuklar açarak, ipek örerek petekleri kullanılmaz hale getirmektedir. Son evreye kadar ördüğü ipeklerin kendisi için bir önemi yokken, son evrede ördüğü ipekleri pup evresi için kullanmaktadır. Birkaç maddeyle birleştirerek ördüğü son ipek ile pup evresinde kendisini korumaya almaktadır (Smith, 1965).

Yumurtadan yaklaşık 1 mm uzunluğunda çıkmasına rağmen larval evre boyunca 25-30 mm'ye kadar uzayabilir. Sklerotik yapı koyu kahve yansıması gibi görünmekle birlikte diğer tüm yapıları renksizdir (Özer, 1961; Smith, 1965; Akyol ve ark., 2009).

Pup evresi ortam şartlarına bağlı olarak 8 günden 62 güne kadar uzayabilir (Akyol, 2013). Pup evresinde ilk başta renk pigmentine sahip değilken 24 saat içinde pigment yoğunlaşması ve renklenme başlar (Özer, 1961; Smith, 1965). Yaklaşık olarak pup evresinde 4-15 mm büyüklüğe sahiptir. Pup evresinde cinsiyet tespiti yapmak da mümkündür. Kanatların ortasında apikal kısımda bulunan boşlukta bir çentik bireyin erkek olduğunu göstermektedir. Bu çentik ergindeki fallomerlerdir (Şekil 1.5). Dişilerde ise bu kısım neredeyse tamamen düzdür. Abdominal sternumun 8. skleritinde bir boşluk

vardır. Bu boşluk dişi ergindeki bursa copulatriks açıklığıdır (Şekil 1.6) (Smith, 1965). Ördükleri koza beyaz renktedir. Uçları kapalı değildir ve ortalama 12-20 mm boyutlarındadır (Özer, 1961). Pup evresinde beslenme gözlenmez, bu evrede sadece metamorfoz geçirilir (Charrière ve Imdorf, 1997; Akyol, 2013).



Şekil 1.5. *G. mellonella* erkek pupu (Daire içindeki alan fallomerlerdir)



Şekil 1.6. *G. mellonella* dişi pupu (Daire içindeki alan Bursa copulatriks açıklığıdır)

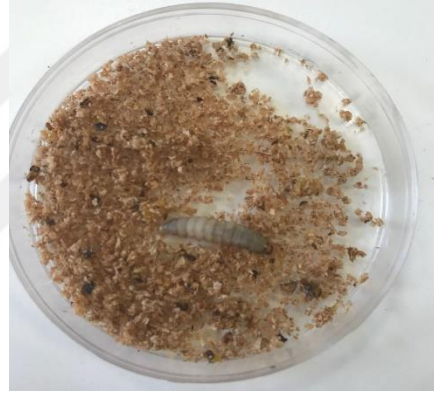
Ergin bireyler sarı-kahverengi ya da koyu gri tonlarında olurlar ve ortalama olarak

genellikle dişiler erkek bireylerden daha büyük olurlar. Erkek bireylerin kanatlarında içe doğru eğik bir morfoloji gözlenirken dişilerde bu durum gözlenmez. Dişiler ise palplerinin öne doğru uzamış olmasıyla dikkat çekerler (Özer, 1961).

Ergin birey anatomik olarak baş, toraks ve abdomen kısmı olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Ağız köreldiğinden dolayı besin alımı bu evrede gözlenmez (Charrière ve Imdorf, 1997). Baş kısmı diğer Lepidopterlerle benzerlik gösterirken bileşik göz yapısı farklılık yaratmaktadır. Pul, kanat, anten yapıları ile eşsiz bir vücuda sahiptir (Smith, 1965). Dişi ergin bireyler ömürleri boyunca ortalama olarak 280 adet yumurtayı doğaya bırakmaktadır. Bir dişinin bıraktığı yumurta sayısı 1000'e kadar ulaşabilir (Özer, 1961; Sezer ve Ozalp, 2011). Bir yıl içinde 4-6 nesil meydana gelir ve aydınlıkta hareket etmekten çekinirler (Charrière ve Imdorf, 1997; Akyol, 2013).



(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 1.7. *G. mellonella*'nın yaşam döngüsü (A) yumurta, (B) larva, (C) pup, (D) ergin

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1 *G. mellonella* Kültürünün Oluşturulması ve Devamının Sağlanması

Deney organizması *G. mellonella* L. Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı'nda yetiştirilmiştir. Yaşam koşulları 26 ± 2 °C, 60 ± 5 bağıl nem ve sürekli karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Sıcaklığı sabitlemek için klima kullanılmıştır. Nispi nem ayarı için ise nem alıcı-verici cihazlar kullanılmıştır.

Yumurtadan yeni çıkmış larvalar kararmış kuluçka peteği içine yerleştirilerek büyümeleri sağlandı. Pup evresinden sonra oluşan ergin bireyler içine pelür kağıt yerleştirilmiş beher içerisine konarak üzerleri Amerikan bezi ile kapatıldı. Böylece hava sirkülasyonu engellenmemiş oldu. Birkaç gün içinde ergin dişiler pelür kağıda yumurtalarını bıraktılar. Stereomikroskop altında incelenen yumurtalar, pelür kağıt kesilerek her bir kavanoza 50 adet olacak şekilde yerleştirildi ve üzerlerine özel olarak hazırlanmış yarı sentetik besin (Bronskill, 1961; Sak ve ark., 2006) eklenerek beslenmeleri sağlandı. Kavanozların ağzı Amerikan bezi ve delikli metal kapaklarla kapatıldı. Yumurtadan çıkan larvalar sürekli kontrol altında tutuldu, düzenli olarak besin ilavesi gerçekleştirildi. Son evreye ulaşan larvalar içinde katlanmış pelür kağıt bulunan petri kaplarına alındı. Bu kaplar içerisinde pup evresine geçen bireyler alındı ve kağıdı kesmek suretiyle içerisinden özenle çıkarıldı. Elde edilen puplarla ergin birey stoğu oluşturuldu. Stok kültür ve tüm bu işlemler, çalışmalar boyunca takip ve tekrar edildi.

Yarı sentetik besini hazırlamak için 430 g kepek, 75 ml süzme çiçek balı, 150 ml gliserin, 100 g öğütülmüş koyu renkli kuluçka peteği ve 75 ml dH₂O (distile su) kullanıldı. İlk olarak 100 g öğütülmüş petek bir kap içerisine alındı. Üzerine 250 g kepek eklenerek karıştırıldı. Karışıma 75 ml bal eklenerek yoğurulmaya başlandı. Yoğurma işlemi devam ederken üzerine 150 ml gliserin ve daha sonra da 75 ml dH₂O eklendi. Geriye kalan 180 g petek de eklenerek yoğurulduktan sonra besin hazır hale gelmiş oldu. Bileşenlerin tam olarak emilip homojenleşmesi için besin, +4 °C'de 24 saat boyunca bekletildi ve daha sonra kullanıldı (Bronskill, 1961; Sak ve ark., 2006).

2.2 Azadirachtin'in Force-Feeding Yöntemi ile Böceklerle Uygulanması

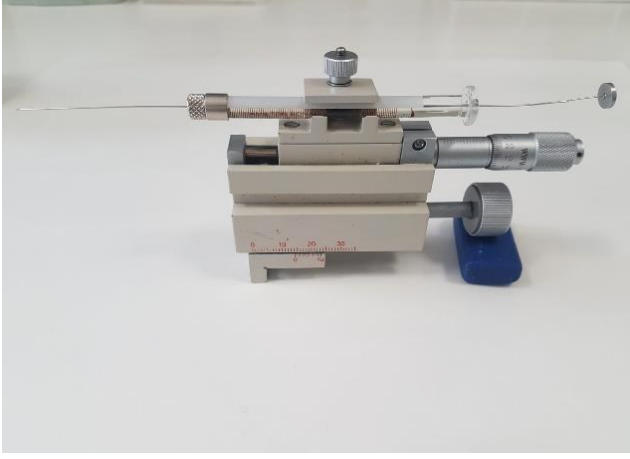
Hazırlanan stok kültür içerinden deneylerde kullanılacak larvalar elde edildi. Force-feeding uygulaması için 0,16-0,17 g aralığındaki sağlıklı larvalar seçildi ve her birinde bir larva olacak şekilde 60 mm'lik petri kapları içerisine yerleştirildi. Uygulama öncesi böcekler 3 saat aç bırakılarak uygulama esnasında ağzını daha kolay açması ve böylelikle daha kolay beslenmesi sağlandı.

Uygulamada kullanılmak üzere Azadirachtin (Technical) (SigmaAldrich, N-11107-10MG, 1510000) dozları hazırlandı. Kullanılacak dozları belirlemek için Dere ve ark. (2015)'nin yaptığı çalışma baz alınmış ve 0,5, 1, 1,5 ve 2 µg/larva dozları kullanılmasına karar verilmiştir. AZA'yı çözmek için ise böceğe en az zarar veren %10'luk Etanol kullanıldı. Kontrol gruplarından birine sadece %10'luk Etanol ile muamele edildi. Diğer kontrol grubuna ise sadece dH₂O verildi. AZA çözeltisini hazırlamak için 1 mg AZA ve 1 ml %10'luk Etanol ependorf tüpü içerisinde uzun süre vortekslendi. Tüm AZA'nın çözündüğünden emin olundu. Hazırlanan stok çözelti +4 °C'de, ışık almayacak şekilde muhafaza edildi.

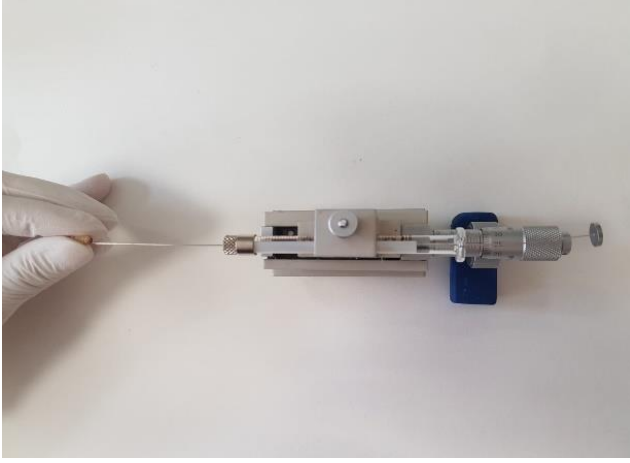
Force-feeding uygulaması için Ramarao ve ark. (2012) çalışması baz alınarak 10 µl'lik Hamilton enjektör (26s gauge) kullanıldı. Önce aseton daha sonra dH₂O kullanılarak iyice temizlendikten sonra kullanıma hazır olan enjektör mikromanipülatör yardımıyla hareket etmeyecek şekilde sabitlendi (Şekil 2.1).

Hazırlıklar tamamlandıktan sonra böcekler sabitlenmiş enjektöre paralel tutularak zarar görmeyecek şekilde ağız yoluyla yemek borusundan içeri doğru AZA ile beslendi. Hazırlanmış olan çözeltiden her bir böceğe 5 µl AZA çözeltisi verildi. Her uygulama öncesi içerisinde AZA bulunan ependorf tüpler vortekslenerek çözeltinin homojenleşmesi sağlandı. Böylelikle hazırlanan çözelti ile birey başına düşen AZA miktarı hesaplandığında her bir bireye 5 µg AZA enjekte edilmiş oldu. Böcekler aç bırakıldıkları için enjektör ucuyla hafif uyarılmaları neticesinde ağızlarını kolaylıkla açtılar. AZA enjekte edilirken oldukça yavaş çalışıldı. Uygulama sonrası enjektör tekrar aseton ve dH₂O ile temizlenerek kurumaya bırakıldı.

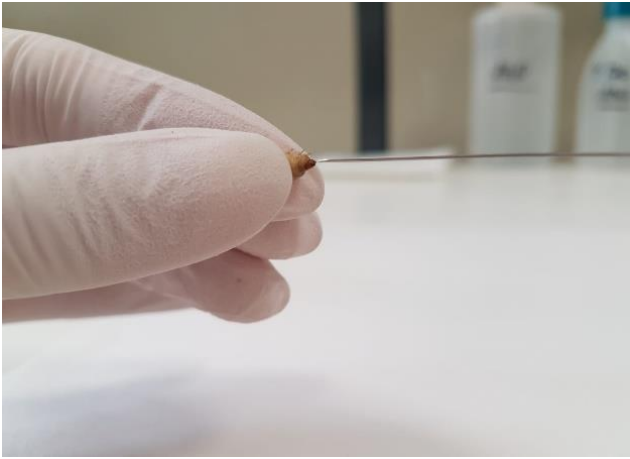
Deneyde kontrol grubu dahil 6 grup oluşturuldu. Her bir grup 5 birey olacak şekilde 3 tekrar uygulandı. Force-feeding sonrası 48 saat beklendi ve süreç sonunda apoptoz ve enkapsülasyon uygulamalarına geçildi.



(A)



(B)



(C)

Şekil 2.1. Larvaların Azadirachtin ile force-feeding yöntemi kullanılarak beslenmesi (A) Mikromanipülatör yarımıyla sabitlenen enjektör, (B) Larvanın beslenme anının üstten

görüntüsü, (C) Larvanın beslenme anının yandan görüntüsü

2.3 Apoptotik İndeks, Mitotik İndeks ve Mikronukleus Durumu

Er ve ark. (2011)'nin uygulamaları incelenerek apoptoz için aynı yöntemin uygulanmasına karar verildi. Olympus BX51 marka floresan mikroskop kullanılan çalışmada hücre boyaması için Ethidium Bromide (EB) ve Acridine Orange (AO) flouresan boyalar kullanıldı. Hazırlanan preparatlarda apoptoz, nekroz, mitotik indeks ve mikronukleus durumu incelendi.

Uygulama öncesinde boyalar hazırlandı. PBS içerisine 100 µg/ml AO ve 100 µg/ml EB derişimlerinde hazırlanan boyalar ışık almayacak tüpler içerisinde +4 °C'de muhafaza edildi. Uygulamada floresan mikroskop kullanıldı. 48 saat önce force-feeding uygulanmış *G. mellonella* larvalarının sternumları %10'luk metanol ile temizlendi. Temizleme işlemi sonrasında böcekler abdominal proleg önünden delindi ve mikropipet tüp yardımıyla buradan 5 ml hemolenf çekildi. Çekilen hemolenf lam üzerine yavaşça bırakıldı. Üzerine sırasıyla 100 µg/ml AO ve 100 µg/ml EB çözeltilerinden 5'er ml mikropipet yardımıyla yine yavaşça eklendi (Şekil 2.2). Karanlık ortamda yapılan bu uygulamalardan sonra hücrelerin iyice boyanması için bir süre beklenildi. Hazır olan preparatlar floresan mikroskop altında, mavi ışıkta incelenmeye başlandı. İnceleme her bir böceğe ait preparatta 1000 adet hücre sayılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar yüzde oranları şeklinde değerlendirildi.

Cendoroglo ve ark. (1999) ve Kosmider ve ark. (2004) çalışmaları baz alınarak incelenen erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücreler aşağıdaki değerler dikkate alınarak değerlendirildi.

- Canlı hücreler: Nukleus yeşil, sitoplazma turuncu ya da kırmızı gözlenebilir
- Erken apoptoz: Nukleus parlak yeşil görünür. Hücre membran bütünlüğü korunur fakat kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu gözlenir
- Geç apoptoz: Membran bütünlüğü bozulan hücrelerin içine EB girer ve nukleusu turuncuya boyar. Kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu gözlenir. Sekonder nekroz ya da apoptotik nekroz olarak da isimlendirilebilir
- Nekroz: Şekil olarak normal görünen nukleus, turuncudur.

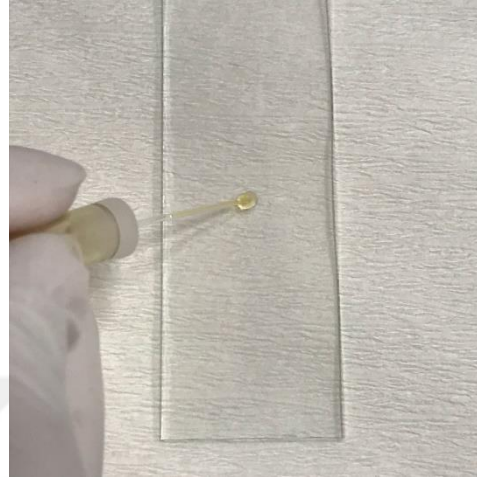
Sayılan 1000 hücre içerisinde aynı boyutlarda iki nukleus içeren hücreler mitotik

indeksi belirlemek amacıyla yüzde oranlar şeklinde değerlendirildi.

Aynı şekilde 1000 hücre içerisindeki mikronukleus yapısı içeren hücreler de mikronukleus yüzdesinin hesaplanmasında kullanıldı.



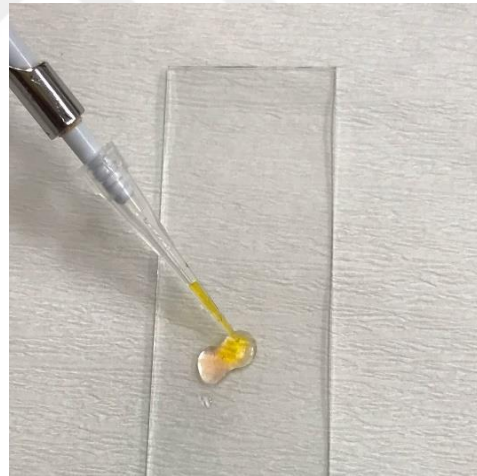
(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 2.2. Hemolenfin Ethidium Bromide ve Acridine Orange ile boyanması (A) Hemolenfin alınması (B) Hemolenfin lam üzerine bırakılması (C) Hemolenfin AO ile boyanması (D) Hemolenfin EB ile boyanması

2.4 Enkapsülasyon ve Melanizasyon

AZA'nın *G. mellonella* üzerindeki epkapsülasyon ve melanizasyona etkisini incelemek için böcek için yabancı madde olatak algılanıp enkapsüle edilecek Sephadex DEAE A-25 (40-120 µm çapta) kromotografi boncukları kullanıldı. Boncuklar, enjekte edilmeden önce, enkapsülasyon sonrasında daha iyi gözlemlenebilmesi için Coomassie mavisi (Brilliant Blue G) boyamaya tabi tutuldu. Boyama işlemi için bir miktar boncuk ependorf tüp içine alınarak üzerine PBS içinde hazırlanmış %1'lik Coomassie mavisi eklendi. Boncuklar 1 saat boyunca bu boya içerisinde bekletildi. Sonrasında boya üzerine eklenen PBS şeffaflaşınca kadar boncuklar, PBS ile yıkandı. İşlem tamamlandıktan sonra 50 µl kapasiteli Hamilton marka (22 gauge) mikroenjektör yardımıyla 10 µl PBS çekildi. Enjektör stereomikroskop altında incelenerek çekilen PBS içerisinde en az 10-15 adet Sephadex A-25 boncuk mevcut olduğundan emin olundu. Çekilen boncuklar, daha önceden force-feeding uygulamasına tabi tutulmuş *G. mellonella* larvalarının içerisine enjekte edildi. Yaralanmanın etkisiyle hemolenfin vücut dışına akışını engellemek için enjekte edilen bölge vazelin ile kapatıldı. Eneksiyon işleminden sonra her bir tekrar için 5 adet böcek 4 saatlik enkapsülasyon durumunu gözlemlemek için kullanılırken her bir tekrar için 5 adet böcek ise 24 saatlik enkapsülasyon durumu gözlemlemek için kullanıldı. Uygulama sonrası gerekli süre beklenildikten sonra *G. mellanella* larvaları stereomikroskop altında disekte edilerek enjekte edilmiş olan boncuklar tüm vücut kısımlarında arandı. Elde edilen boncuklar üzerinde bir damla PBS bulunan lam üzerine alındı. Tüm boncukların bulunduğundan emin olunduktan sonra lam, lamel ile yavaş bir şekilde kapatıldı. Elde edilen preparat Olympus marka ışık mikroskobu altında incelenerek enkapsülasyon ve melanizasyon durumları Richards ve Dani (2008) ve Er (2011) çalışmaları baz alınarak değerlendirildi.

- Boncuk üzerinde hiç hemosit yoksa veya birkaç hemosit var ise enkapsüle olmamış,
- Boncuk üzerinde 4-9 katman hemosit var ise zayıf enkapsüle olmuş,
- Boncuk üzerinde 10 ve daha fazla hemosit katmanı var ise güçlü enkapsüle olmuş olarak değerlendirildi.

Aynı preparat ışık mikroskobu altında aynı zamanda böceğin Sephadex A-25 boncuğa karşı oluşturduğu melanizasyon tepkimesi de incelenirken boncuklar;

- Boncuk etrafındaki hücrelerde hiçbir melanin gözlenmediği takdirde melanize olmamış,
- Boncuk etrafındaki hücrelerin %20'si ya da daha azı melanize olmuşsa zayıf melanizasyon tepkisi,
- Boncuk etrafındaki hücrelerin %20- %70'i melanize olmuşsa orta melanizasyon tepkisi,
- Boncuk etrafındaki hücrelerin %70'den fazlası melanize olmuşsa güçlü melanizasyon tepkisi olarak değerlendirildi (Kaya, 2015).

2.5 İstatistiksel Analiz

AZA uygulamasının *G. mellonella* larvalarının hemositlerine etkilerini incelemek için elde edilen veriler SPSS istatistik programı (SPSS, versiyon 18.0, SPSS Science, Chicago, IL) kullanılarak analiz edildi. Elde edilen veriler öncelikle “Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)” ile değerlendirildi. ANOVA ile değerlendirildikten sonra verilerin varyansları homojen ise Tukey HSD, varyanslar homojen değilse Tamhane T2 testiyle karşılaştırıldı. Yapılan tüm istatistik testlerinde $P < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 AZA'nın İmmün Sisteme Etkisi

AZA'nın *G. mellonella* larvalarının hemositleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla force-feeding yöntemiyle 4 farklı dozda (0.5, 1, 1.5 ve 2 µg/larva) AZA larvalara uygulandı. Kontrol grubu olarak distile su ile beslenen bir gruba ek olarak etanol ile beslenen bir başka grup da oluşturuldu. Etanol AZA'nın çözücüsü olarak kullanıldı. Dozlar Dere ve ark.'nın 2015 yılındaki çalışmaları dikkate alınarak belirlendi.

AZA uygulanacak larvaların işleme uygun bir ağırlığa (0.16-0.17 g) ulaşmış olduklarından emin olundu. Daha önce yapılan çalışmalarda AZA'nın böcekler üzerinde toksik etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Yaptığımız bu çalışma ile hemositler üzerinde ne ölçüde etkili olduğunu gözlemlemiş olduk.

3.2 Farklı Dozlardaki AZA'nın *G. mellonella* Larvalarının Hemositlerinde Apoptotik İndeks, Mitotik İndeks ve Mikronukleus Oluşumuna Etkisi

3.2.1 Farklı Dozlardaki AZA'nın *G. mellonella* Larvalarının Hemositlerinde Apoptotik İndekse Etkisi

Yaptığımız çalışmada AZA ile beslenmiş ve uygulama sonra 48 saat bekletilmiş olan *G. mellonella* larvalarından alınan hemolenf kullanılarak apoptotik indeks belirlemesi yapılmıştır. Hazırlanan preparatlarda canlı hücreler, erken ve geç apoptoz hücreler ile nekroza (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4) uğramış hücreler gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre farklı dozlardaki AZA, *G. mellonella* larvalarının apoptoz mekanizmasında değişikliklere sebep olmaktadır. AZA grupları ile kontrol grupları arasında istatistiki olarak farklılık gözlemlenmiştir. Yapılan deneyde elde edilen sonuçlara göre apoptotik indeks oranları Şekil 3.5 ve Tablo 3.1 gösterilmiştir.

Veriler incelendiğinde kontrol gruplarında bulunan larvaların canlı hücre yüzdelерinin yüksek olduğu ve 1,0 ve 1,5 µg/larva AZA uygulanan gruplarla aralarında anlamlı bir fark gözlemlenmektedir. Bu gruplarda AZA canlı hücre sayısını azaltıcı etki göstermiştir. 0,5 ve 2,0 µg/larva AZA uygulanan grupların diğer gruplarla aralarında

istatistiki olarak önemli bir fark yoktur. En yüksek canlı hücre sayısı distile su uygulanan kontrol grubu iken en düşük canlı hücre sayısına sahip olan grup 1,0 µg/larva AZA uygulanan gruptur ($F= 0,767$; $df 5,12$; $P= 0,591$).

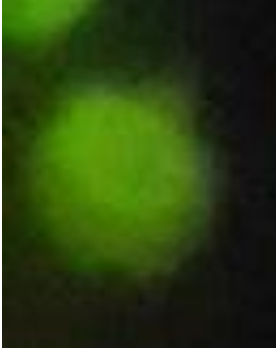
Erken apoptoz oranı incelendiğinde 1,5 µg/larva AZA uygulanan grup ile distile su ve 0,5 µg/larva AZA uygulanan grup arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Etanol, 1,0 ve 2,0 µg/larva AZA uygulanan gruplar ile diğer gruplar arasında fark gözlenmemiştir. AZA, 1,5 µg/larva AZA uygulanan grupta erken apoptoz oranını oldukça yükseltmiştir ve en yüksek erken apoptoz yüzdesine sahip olan grup 1,5 µg/larva AZA uygulanan grup olmuştur ($F= 0,573$; $df 5,12$; $P= 0,720$).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları incelediğimizde yüksek AZA dozlarında geç apoptozu uğrayan hücre yüzdesinin arttığı görülmektedir. En yüksek orana sahip olan grup 1,5 µg/larva AZA uygulanan gruptur. Diğer AZA dozları geç apoptoz yüzdesini yükseltici etki gösterirken 0,5 µg/larva AZA, larvalarda geç apoptozu azaltıcı etki göstermiştir. Bununla birlikte kontrol gruplarıyla 0,5 µg/larva AZA uygulanan grup arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kontrol grupları ve 0,5 µg/larva AZA uygulanan grupla diğer gruplar arasında farklılık söz konusudur ($F= 1,434$; $df 5,12$; $P= 0,281$).

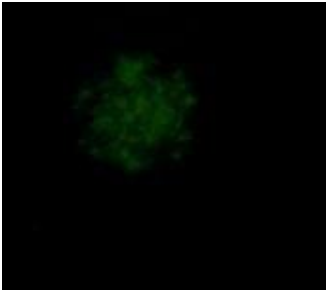
AZA muamelesi sonucu nekroza uğrayan hemosit oranları incelendiğinde 0,5 ve 1,0 µg/larva AZA uygulanan gruplarla diğer gruplar arasında istatistiki fark bulunmuştur. Bu gruplarda nekroz tetiklenmiş, nekroz yüzdesi artmıştır. Kontrol grupları en düşük yüzdeye sahip gruplardır. Nekroz oranının en fazla arttığı grup 0,5 µg/larva AZA uygulanan grup olarak bulunmuştur ($F= 0,775$; $df 5,12$; $P= 0,586$).

Canlı (2017) yaptığı yüksek lisans çalışmasında TiO_2 nanopartikülünün *G. mellonella* larvaları üzerindeki apoptoz etkisini araştırmıştır ve sonuçlarına göre TiO_2 nanopartikülüne bağlı olarak apoptoz tepkimesi baskılanmıştır. Kaya (2015), doktora çalışmasında kaliks sıvısının *G. mellonella* larvalarında apoptoz tepkimesinde ortaya çıkardığı etkiyi incelemiş ve doza bağlı olarak canlı hücre sayısında azalma olduğunu kaydetmiştir. Cypermethrinin *P. turionellae* hemositlerinde apoptotik etkisinin incelendiği çalışmada, doza bağlı olarak apoptotik hücre sayısında artış olduğu kaydedilmiştir (Sak, 2004). Blanco ve ark. (2017)'nin yaptığı çalışmada *G. mellonella* larvalarına gram negatif bakteri *A. pleuropneumoniae*'nin çeşitli klinik strüktürlerini enjekte ederek apoptoz ve nekroz

durumlarını incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar ile çalışmamızın sonuçları kıyaslandığında *G. mellonella* larvalarının apoptoz ve nekroz durumları bizim çalışmamızla uyumluluk göstermektedir. GA₃'ün *G. mellonella* larvalarındaki apoptotik indekse etkisinin incelendiği çalışmada apoptoz ve nekroz verileri çalışmamızla uyumluluk göstermektedir. Canlı hücre indeksi azalmıştır, erken apoptozda farklılık anlamsızdır, nekroz ve geç apoptoz durumlarında kontrol grubuyla kıyaslamada doza bağlı artış olmuştur (Altuntaş ve ark., 2012). Çelik (2014) yaptığı çalışmada IAA (indol-3 asetik asit)'nin *Achoria grisella* hemositlerindeki apoptoz etkisine bakmıştır. Farklı dozlarda IAA'nın apoptozu tetiklediğini belirtmiştir. Huang ve ark. (2011) *S. litura* türünde yaptıkları çalışma ile AZA'nın böcekler üzerinde apoptoz mekanizmasını etkileyici, apoptozu tetikleyici etkisi bulunduğunu literatüre eklemişlerdir. Çalışmamız, *G. mellonella* larvalarının insektisitlere karşı oluşturduğu immün cevabın araştırıldığı çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.



Şekil 3.1. *G. mellonella* larvalarında canlı hemosit



Şekil 3.2. *G. mellonella* larvalarında erken apoptotik hemosit



Şekil 3.3. *G. mellonella* larvalarında geç apoptotik hemosit



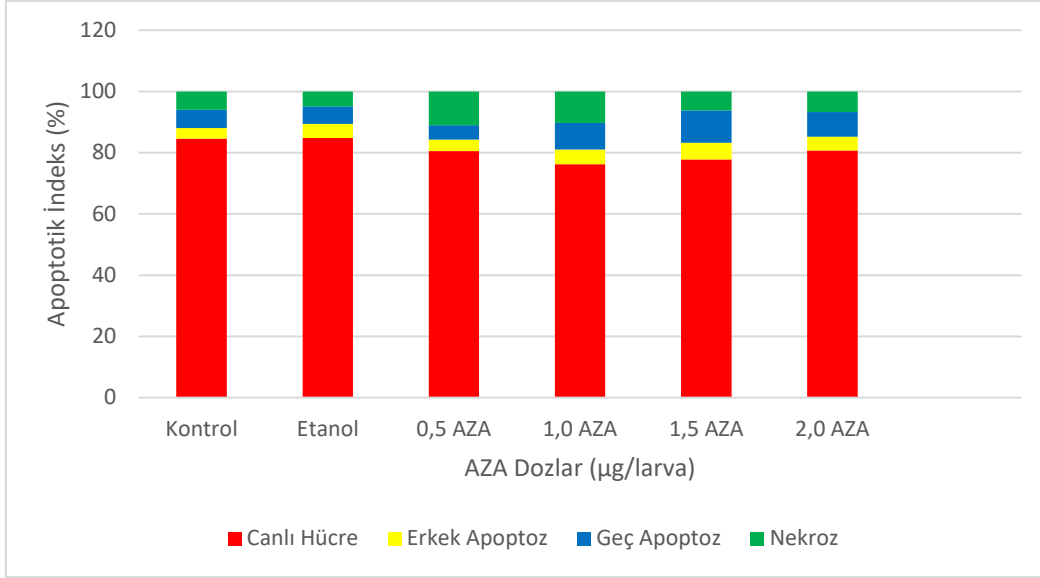
Şekil 3.4. *G. mellonella* larvalarında nekrotik hemositler

Tablo 3.1. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde apoptotik indekse etkisi

AZA Dozları (µg/larva)	Apoptotik İndeks (%) (Hücre / 1000) (% Ort. ^a ± SH ^b)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz ^c	Nekroz
Kontrol (distile su)	84,60 ± 0,030a	3,50 ± 0,020a	05,90 ± 0,010a	06,00 ± 0,050a
Kontrol (10% Etanol)	84,85 ± 0,010a	4,60 ± 0,010a	05,75 ± 0,020a	04,80 ± 0,030a
0.5	80,57 ± 0,040ab	3,67 ± 0,020a	04,79 ± 0,040a	10,97 ± 0,030b
1.0	76,25 ± 0,009 b	4,75 ± 0,010a	08,70 ± 0,100b	10,30 ± 0,040b
1.5	77,75 ± 0,050 b	5,50 ± 0,030a	10,50 ± 0,040b	06,25 ± 0,040a
2.0	80,70 ± 0,020ab	4,50 ± 0,010a	08,10 ± 0,010b	06,70 ± 0,030a

^a Her biri 5 larva ile yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

^b İstatistiki olarak önemli farklılıklar a-b harfleri ile belirtilmiştir. (P>0.05, Tukey's HSD test, Tamhane T2^c).



Şekil 3.5. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde apoptotik indekse etkisi

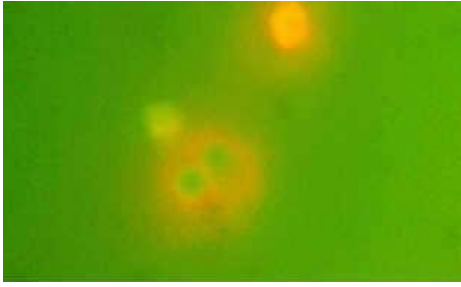
3.2.2 Farklı dozlardaki AZA'nın *G. mellonella* larvalarının hemositlerinde mitotik indekse etkisi

Daha önce de belirtildiği gibi hazırlanan preparatlarda aynı zamanda mitoz geçiren hücreler belirlenip mitotik indeks (Şekil 3.6) ölçümleri de yapılmıştır. Deney sonucu elde edilen veriler Tablo 3.2 gösterilmiştir.

Bulgular değerlendirildiğinde en yüksek mitotik indekse sahip olan grup 0,5 µg/larva AZA uygulanan gruptur. Diğer gruplarla arasında istatistiki olarak önemli fark bulunmaktadır. Kontrol gruplarıyla geriye kalan gruplar arasında bir fark bulunmamaktadır. En düşük mitotik indekse sahip gruplar kontrol gruplarıdır. Yüksek AZA dozlarında mitotik indeks artışı istatistik olarak önemsizdir ($F= 0,771$; $df 5,12$; $P= 0,588$).

Daha önce yapılan çalışmalarda *G. mellonella* dolaşımında yer alan hemositlerin %1 ila %8'inin mitotik evrede olduğu belirtilmiştir (Beaulaton, 1979; Altuntaş ve ark.,2012; Kaya, 2015) Çalışmamızın sonuçları literatürdeki verilerle uyumluluk göstermektedir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde Taşkiran (2016) çalışmasında *G. mellonella* larvalarının hemositleri üzerinde AZA'nın etkisini incelemiştir. AZA'yı uygulama yöntemi çalışmamızdan farklı olmakla birlikte mitotik indekse ait veriler AZA'nın tepkimeleri etkilediğini göstermektedir. Kaya (2015) *G. mellonella* larvalarıyla yaptığı çalışmada IAA'nın hemositlerde mitotik indeksi arttırıcı etki gösterdiğini

gözlemlemiştir. Çalışmamız, önceki çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.



Şekil 3.6. *G. mellonella* larvalarında mitoz bölünme evresindeki hemosit

Tablo 3.2. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde mitotik indekse etkisi

AZA Dozları (µg/larva)	Mitotik İndeks (%) (hücre/1000) (%Ortalama ^a ±SH ^b)
Kontrol (distile su)	1,06 ± 0,0008a
Kontrol (10% Etanol)	1,07 ± 0,0010a
0.5	1,86 ± 0,0150b
1.0	1,18 ± 0,0040a
1.5	1,12 ± 0,0005a
2.0	1,16 ± 0,0030a

^a Her biri 5 larva ile yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

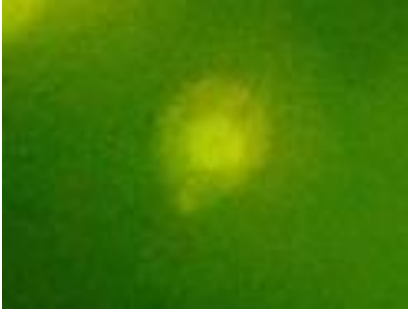
^b İstatistiki olarak önemli farklılıklar a-b harfleri ile belirtilmiştir. (P<0.05, Tamhane T2^c).

3.2.3 Farklı dozlardaki AZA'nın *G. mellonella* larvalarının hemositlerinde mikronukleus oluşumuna etkisi

Apotoz ölçümleri yapılırken aynı preparat üzerinde eş zamanlı olarak AZA'nın *G. mellonella* larva hemositleri üzerindeki mikronukleus oluşumuna (Şekil 3.7) etkisi de incelendi. Çalışma sonucu elde edilen bulgular Tablo 3.3 gösterilmiştir.

Elde edilen verilere göre kontrol grupları ile 0,5 ve 1,0 µg/larva AZA uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. 0,5 µg/larva AZA uygulanan grupta mikronukleus artışı mevcuttur ve bu grup ile 1,5 ve 2,0 µg/larva AZA uygulanan gruplar arasında da fark yoktur. 1,5 ve 2,0 µg/larva AZA uygulanan gruplar diğer gruplarla kıyaslandığında mikronukleus artışı gözlenmektedir. Bu gruplar ile kontrol grupları arasındaki fark önemlidir. (F= 1,522; df 5,12; P= 0,255).

Farklı dozlarda cypermethrin uygulanan *G. mellonella* larvalarındaki mikronukleus oluşumuna ait verilerin değerlendirilmesi sonucunda mikronukleus oluşumunda artış gerçekleştiği kaydedilmiştir (Uçkan ve Sak, 2010). *G. mellonella* üzerinde bir insektisit çeşidi olan deltamethrinin mikronukleus oluşumuna etkisini inceleyen Kurt ve Kayış (2015)'in elde ettikleri sonuçlara göre insektisit kullanımı mikronukleus oluşumunu artmıştır. Sak (2004) yaptığı doktora çalışmasında cypermethrinin *P. turionellae* hemositlerinde mikronukleus oluşumunu arttırdığını kaydetmiştir. Yüksek dozlarda mikronukleus oluşumu düşük dozlarla kıyaslandığında büyük bir artış gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar *G. mellonella* üzerinde insektisitlerin mikronukleus oluşumuna etkisi açısından bizim çalışmamızla uyumluluk göstermektedir.



Şekil 3.7. *G. mellonella* larva hemositlerinde mikronukleus oluşumu

Tablo 3.3. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde mikronukleus oluşumuna etkisi

AZA Dozları ($\mu\text{g/larva}$)	Mikronukleus (%) (hücre/1000)(Ort. ^a $\pm$ SH ^b)
Kontrol (distile su)	0,04 $\pm$ 0,002a
Kontrol (10% Etanol)	0,04 $\pm$ 0,003a
0.5	0,07 $\pm$ 0,002ab
1.0	0,03 $\pm$ 0,007a
1.5	0,10 $\pm$ 0,007b
2.0	0,11 $\pm$ 0,005b

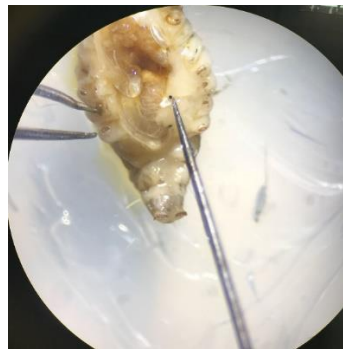
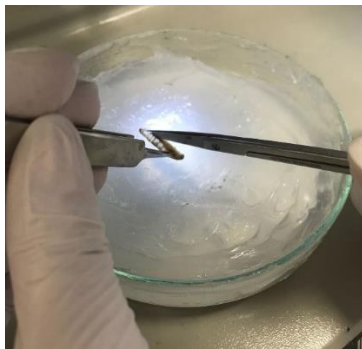
^a Her biri 5 larva ile yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

^b İstatistiki olarak önemli farklılıklar a-b harfleri ile belirtilmiştir. (P>0.05, Tukey's HSD test).

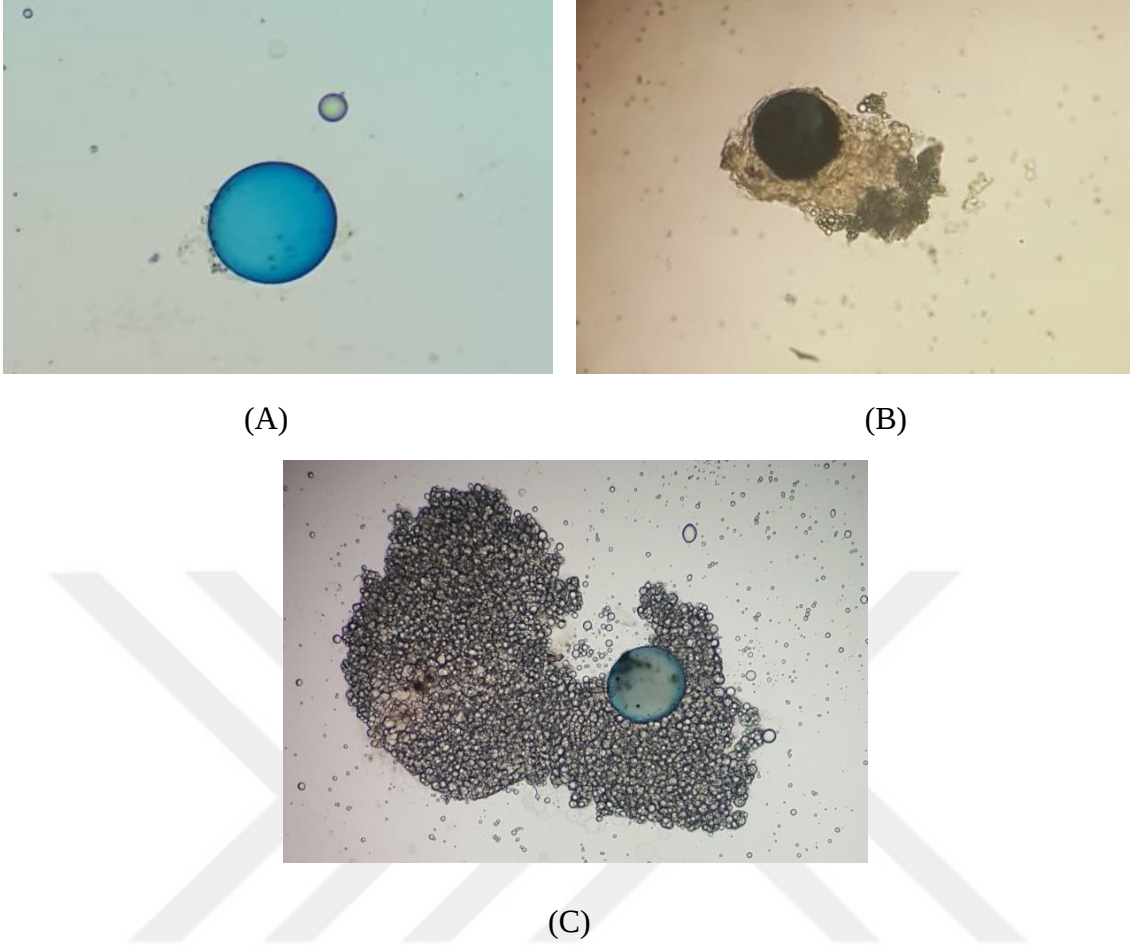
3.3 Farklı Dozlardaki AZA'nın *G. mellonella* larvalarının hemositlerinde Enkapsülasyon ve Melanizasyon Davranışı

3.3.1 Farklı dozlardaki AZA'nın *G. mellonella* larvalarının hemositlerinde enkapsülasyona etkisi

AZA'nın *G. mellonella* larvaları hemositleri üzerinde enkapsülasyon davranışına etkisini incelemek amacıyla force-feeding uygulamasından 48 saat sonra Sephadex DEAE A-25 boncukları enjekte edildi. Bu işlemin ardından 4 ve 24 saat boyunca beklenildi. Daha önce enjekte edilen boncuklar larvaları disekte etmek suretiyle (Şekil 3.8) çıkarılarak enkapsülasyon durumları incelendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. AZA ile beslenmiş *G. mellonella* larvalarının disekte edilmesi



Şekil 3.9. AZA ile beslenmiş *G. mellonella* larvalarından disekte edilmiş Sephadex DEAE A-25 boncukları (A) Enkapsüle olmamış (B) Zayıf Enkapsülasyon (C) Güçlü Enkapsülasyon

Çalışma sonunca elde edilen 4 saatlik enkapsülasyon durumu verileri Tablo 3.4 ve Şekil 3.10 gösterilmiştir. AZA muamelesi sonucunda *G. mellonella* larvalarında 4 saatlik enkapsülasyon durumu incelendiğinde AZA'nın doza bağlı etkileri olduğu gözlenmiştir.

4 saatlik enkapsülasyon olmamış boncuk istatistikleri incelendiğinde istatistiksel olarak distile su, etanol ve 2,0 µg/larva AZA ile muamele eden gruplar arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu gruplar en yüksek yüzdeye sahip gruplardır. 0,5 ve 1,0 µg/larva AZA uygulanan grupların kendi aralarında fark yokken diğer gruplarla aralarında istatistiki fark bulunmaktadır. AZA'nın enkapsülasyon oluşumunu en fazla arttırdığı grup 1,5 µg/larva AZA uygulanan gruptur. Diğer tüm gruplarla arasındaki fark

önemlidir. AZA'nın 4 saatlik enkapsülasyonu artırıcı etkisi olduğu söylenebilir (F= 1,482; df 5,12; P= 0,266).

Zayıf enkapsülasyon durumunda distile su uygulanan grupla 1,0 µg/larva AZA uygulanan grup arasında fark bulunmamıştır. Diğer gruplarla aralarındaki fark istatistiki olarak anlamlıdır. Diğer dozlarda zayıf enkapsülasyon durumu artmıştır. Özellikle yüksek dozlarda yüzdelere oldukça artmıştır (F= 3,706; df 5,12; P= 0,029).

Güçlü enkapsülasyon durumu incelediğinde ise 0,5, 1,0 ve 1,5 µg/larva AZA uygulanan grupların aralarındaki istatistiki fark önemsizdir. Diğer gruplarla 0,5 µg/larva AZA uygulanan grup arasındaki fark da anlamsızdır. 1,0 ve 1,5 µg/larva AZA ile muamele edilen gruplarda güçlü enkapsülasyon oranı artmıştır. Güçlü enkapsülasyonu en fazla etkileyen doz 1,5 µg/larva AZA olarak bulunmuştur (F= 0,955; df 5,12; P= 0,482).

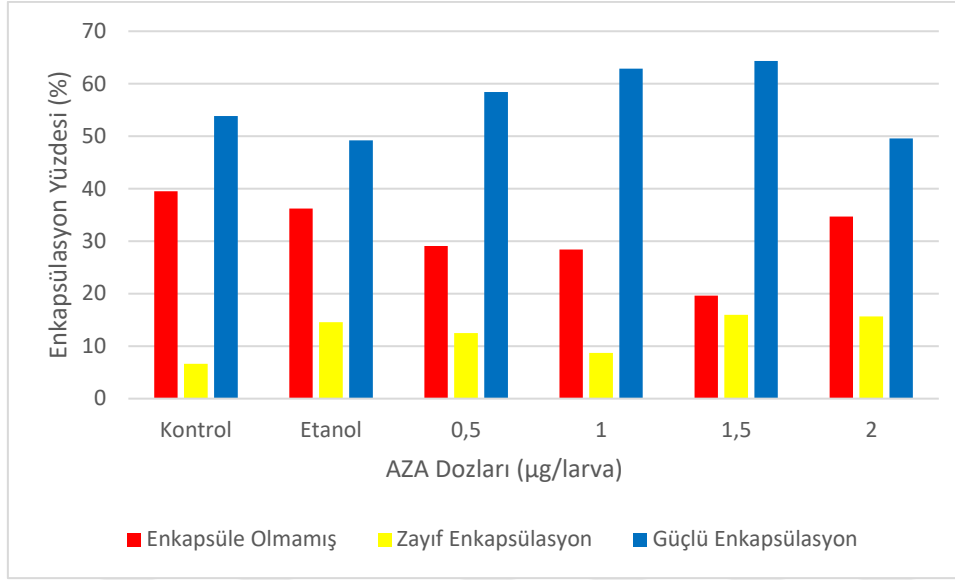
Tablo 3.4. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde 4 saatlik enkapsülasyon davranışına etkisi

AZA Dozları (µg/larva)	Toplam Boncuk Sayısı	Enkapsülasyon Durumu TB ^a (% Ort. ^b ± SH) ^c		
		Olmamış	Zayıf	Güçlü
Kontrol (distile su)	262	101 (39,55 ± 0,050)a	17 (06,60 ± 0,190)a	144 (53,85 ± 0,06)a
Kontrol (10% Etanol)	285	102 (36,20 ± 0,020)a	40 (14,55 ± 0,180)b	143 (49,25 ± 0,04)a
0.5	242	64 (29,10 ± 0,100)b	30 (12,50 ± 0,010)b	148 (58,40 ± 0,09)ab
1.0	325	93 (28,40 ± 0,040)b	28 (08,70 ± 0,090)a	204 (62,90 ± 0,02)b
1.5	238	45 (19,65 ± 0,007)c	38 (16,00 ± 0,004)b	155 (64,35 ± 0,01)b
2.0	260	85 (34,70 ± 0,100)a	40 (15,70 ± 0,160)b	134 (49,60 ± 0,06)a

^a Toplam Boncuk Sayısı

^b Her biri 5 larva ile yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır

^c İstatistiki olarak önemli farklılıklar a-c harfleri ile belirtilmiştir (P<0.05, Tamhane T2).



Şekil 3.10. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde 4 saatlik enkapsülasyon davranışına etkisi

AZA ile beslenmiş *G. mellonella* larvalarından disekte edilerek çıkarılan Sephadex DEAE A-25 boncukları ışık mikroskobu altında incelenerek 24 saatlik enkapsülasyon durumları incelendi. İnceleme sonucu elde edilen veriler Tablo 3.5 ve Şekil 3.11 gösterilmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde kontrol grupları ile deney grupları arasında bir fark gözlenmemiştir. Enkapsüle olmamış boncuk verileri incelendiğinde en düşük yüzdeye distile su uygulanan grubun sahip olduğu gözlenmektedir. Diğer kontrol grubu olan etanol uygulanan grupla 0,5 µg/larva AZA uygulanan grup aynı yüzdeye sahiptirler (F= 0,237; df 5,12; P= 0,939).

Zayıf enkapsülasyon durumu da incelendiğinde benzer bir durum ile karşılaşılmaktadır. Deney grupları ile kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur. En düşük veriye distile su uygulanan kontrol grubu, en yüksek veriye etanol uygulanan kontrol grubu sahiptir. (F= 1,048; df 5,12; P= 0,434).

Güçlü enkapsülasyon durumunda en yüksek orana sahip olan grup distile su ile beslenen kontrol grubudur. En düşük yüzdeye ise etanol ile beslenen kontrol grubu sahiptir. AZA dozu arttıkça enkapsülasyon durumu artış göstermiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (F= 1,212; df 5,12; P= 0,361).

Yapay besine eklenen GA₃ ile beslenen *G. mellonella* larvalarının enkapsülasyon durumlarının incelendiği çalışmada farklı dozlardaki GA₃'ün hemositler üzerinde etkisinin olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızla uyumluluk gösteren sonuçlara göre insektisitlerin enkapsülasyon tepkimesinde değişikliklere yol açtığı düşünülebilir (Altuntaş ve ark., 2012). Çalışmamızda AZA beslenmesi sonra 24 saatlik enkapsülasyon tepkimesinde kontrol gruplarıyla deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. *G. mellonella* larvalarına *Bacillus thuringiensis* enjekte edilten 24 saat sonra oluşan enkapsülasyon sonuçlarının incelendiği çalışmada elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuyla deney grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (Grizanova ve ark., 2014). Yaptığımız çalışma sonuçları daha önce yapılan çalışmalarla tutarlılık göstermektedir.

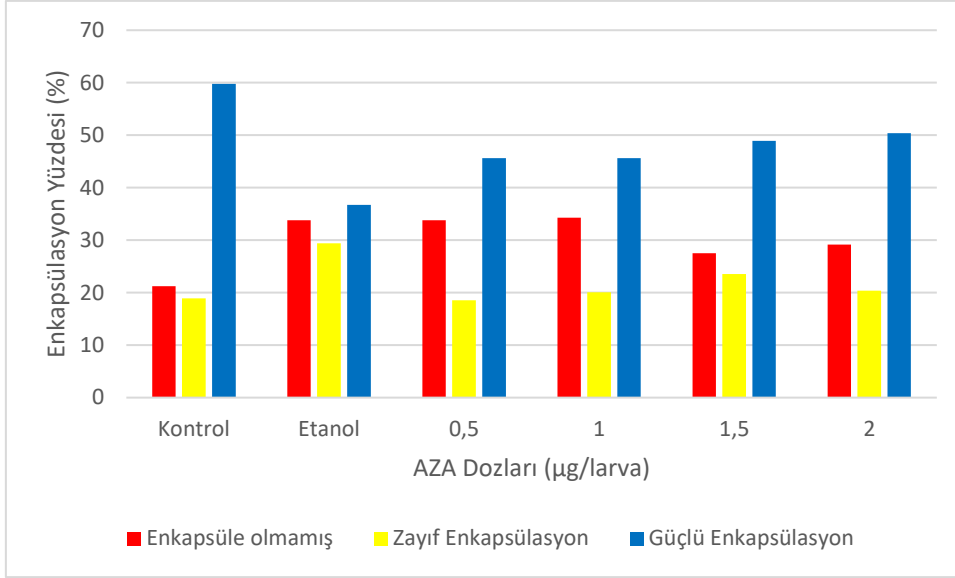
Tablo 3.5. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde 24 saatlik enkapsülasyon davranışına etkisi

AZA Dozları (µg/larva)	Toplam Boncuk Sayısı	Enkapsülasyon Durumu TB ^a (% Ort. ^b ± SH) ^c		
		Olmamış	Zayıf	Güçlü
Kontrol (distile su)	202	40 (21.25 ± 0.09)a	40 (18.95 ± 0.16)a	122 (59.80 ± 0.02)a
Kontrol (10% Etanol)	217	74 (33.80 ± 0.08)a	63 (29.45 ± 0.01)a	80 (36.75 ± 0.07)a
0.5	174	59 (33.80 ± 0,01)a	36 (20.80 ± 0.03)a	79 (45.40± 0.01)a
1.0	195	63 (34.30 ± 0.10)a	40 (20.10 ± 0.05)a	92 (45.60± 0.08)a
1.5	190	52 (27.50 ± 0.04)a	45 (23.55 ± 0.02)a	93 (48.95 ± 0.03)a
2.0	230	61 (29.20 ± 0.12)a	51 (20.40 ± 0.16)a	118 (50.40 ± 0.07)a

^a Toplam Boncuk Sayısı

^b Her biri 5 larva ile yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır

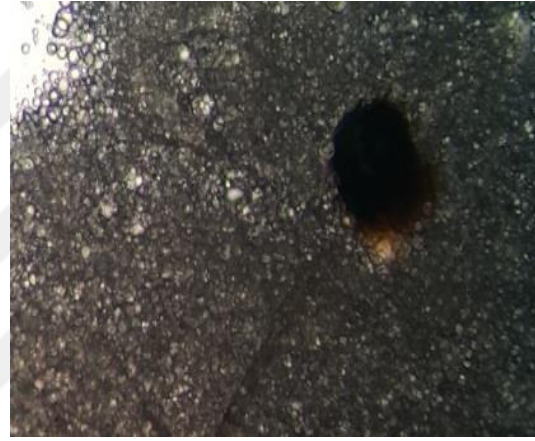
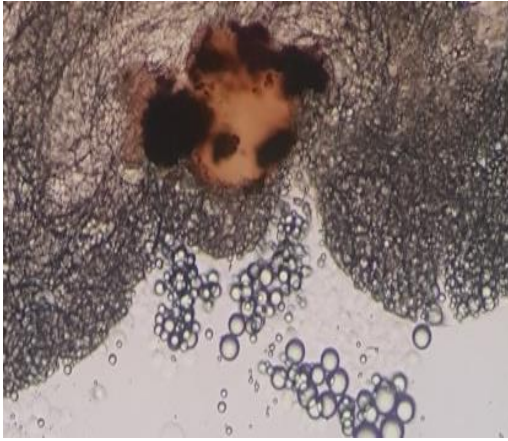
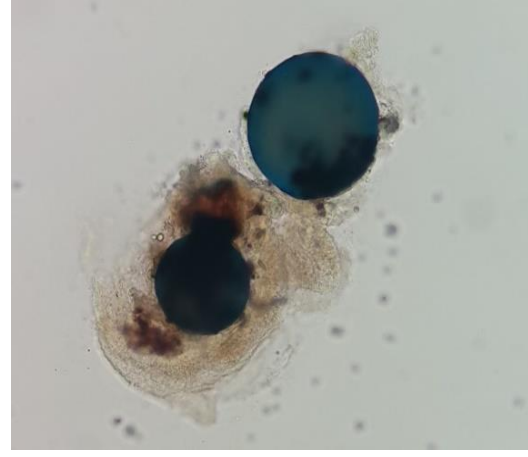
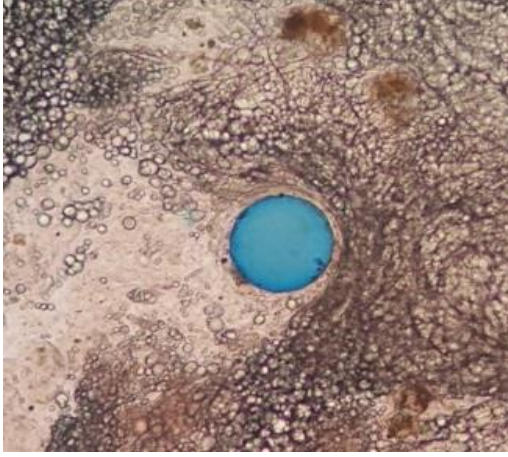
^c İstatistiki olarak önemli farklılıklar a-c harfleri ile belirtilmiştir (P>0.05, Tukey's HSD test).



Şekil 3.11. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde 24 saatlik enkapsülasyon davranışına etkisi

3.3.2 Farklı dozlardaki AZA'nın *G. mellonella* larvalarının hemositlerinde melanizasyona etkisi

Böcekler zararlı maddeyi enkapsüle etmekle birlikte melanize de ederek savunma tepkisinin daha kuvvetli olmasını sağlarlar (Dubovskiy ve ark., 2016). Bu sebeple AZA'nın *G. mellonella* larvalarındaki enkapsülasyon durumu incelenirken aynı Sephadex DEAE A-25 boncukları üzerindeki melanizasyon durumu da incelendi. Melanizasyon durumları da enkapsülasyon durumunda olduğu gibi 4 ve 24 saat olacak şekilde iki grup olarak incelenmiştir. Melanize durumlarını gösteren boncuklar Şekil 3.12 gösterilmiştir.



Şekil 3.12. AZA ile beslenmiş *G. mellonella* larvalarından disekte edilmiş ve melanizasyon durumunu gösteren Sephadex DEAE A-25 boncuklar

AZA uygulamasını takiben 48 saat sonunda enjekte edilen boncuklar, enjeksiyondan 4 saat sonra *G. mellonella* larvalarının disekte edilmesiyle çıkarılarak melanizasyon durumları incelendi. Elde edilen veriler Tablo 3.6 ve Şekil 3.13 gösterilmiştir. Boncukların melanizasyon durumları melanize olmamış, zayıf melanizasyon, orta melanizasyon ve güçlü melanizasyon olarak 4 şekilde incelenmiştir. Elde edilen istatistiksel verilere göre AZA'ya bağlı olarak melanizasyon tepkimesinde farklılıklar gözlenmiştir.

Melanize olmamış boncuklar incelendiğinde elde edilen en yüksek oranın distile su uygulanan kontrol grubunda olduğu gözlenmektedir. Diğer gruplarda melanize olmama durumu azalmıştır. 2,0 µg/larva AZA uygulanan grup ile tüm diğer gruplar arasında fark mevcut değildir. Melanizasyonu en fazla arttıran doz 1,0 µg/larva AZA

uygulanan gruptur. Etanol uygulanan kontrol grubuyla AZA dozları arasında bir fark bulunmamaktadır ($F= 1,267$; $df 5,12$; $P= 0,339$).

Zayıf melanizasyon durumunda ise benzer bir durum gözlenmektedir. $2,0 \mu\text{g/larva}$ AZA uygulanan grup ile diğer gruplar arasında fark bulunmamaktadır. Distile su uygulanan kontrol grubu en düşük yüzdeye sahiptir ve $2,0 \mu\text{g/larva}$ AZA uygulanan grup dışındaki tüm gruplarla arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır. Etanolün 4 saatlik uygulamada zayıf melanizasyonu arttırdığı gözlenmiştir ($F= 0,893$; $df 5,12$; $P= 0,516$).

Orta melanizasyon durumları incelendiğinde en düşük veri distile su uygulanan gruba aittir. Kontrol gruplarıyla farkı olan tek grup $0,5 \mu\text{g/larva}$ AZA uygulanan gruptur ve en yüksek yüzdeye sahip olarak orta melanizasyonu en fazla bu doz arttırmıştır. $1,5$ ve $2,0 \mu\text{g/larva}$ AZA uygulanan gruplarla diğer gruplar arasında bir fark yoktur. Distile su uygulanan kontrol grubuyla kıyaslandığında AZA beslemesinin orta melanizasyonu arttırdığı söylenebilir ($F= 3,045$; $df 5,12$; $P= 0,053$).

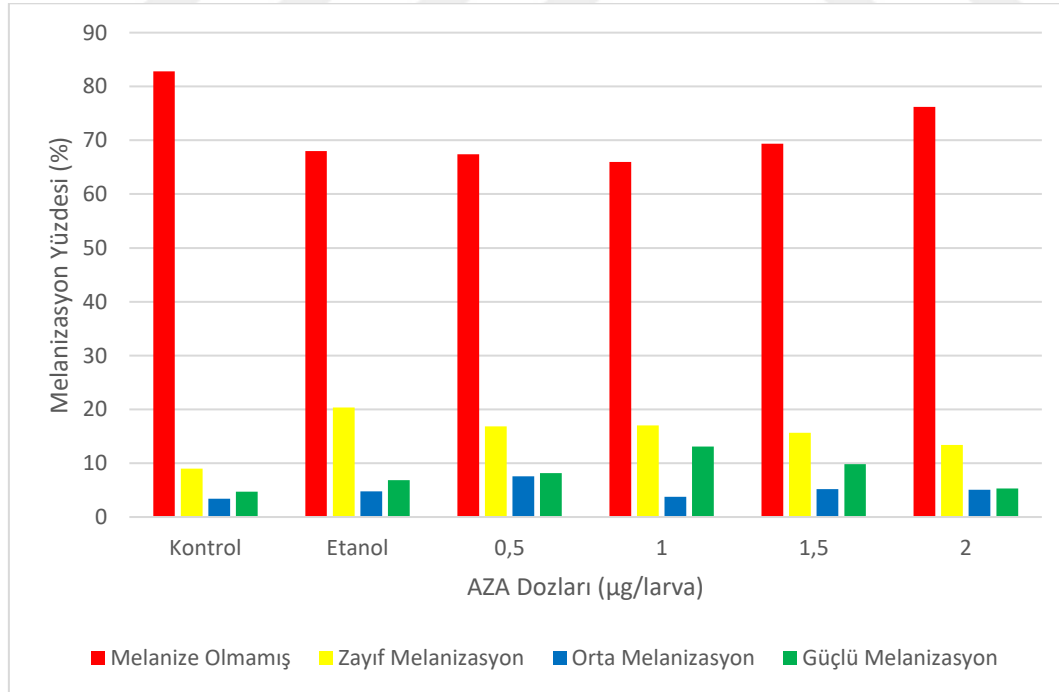
Güçlü melanizasyon durumuna bakıldığında $1,0 \mu\text{g/larva}$ doz uygulanan grupta AZA, artışa sebep olmuştur. Kontrol grupları ve $2,0 \mu\text{g/larva}$ AZA uygulanan grup ile $1,0 \mu\text{g/larva}$ AZA ile beslenen grup arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir. AZA'nın 4 saatlik uygulamada güçlü melanizasyonu arttırdığı söylenebilir. En düşük güçlü melanizasyon verisine distile su ile beslenen grup sahiptir ($F= 1,138$; $df 5,12$; $P= 0,392$).

Tablo 3.6. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde 4 saatlik melanizasyon durumuna etkisi

AZA Dozları ($\mu\text{g/larva}$)	Melanizasyon Durumu (% Ort. ^a $\pm$ SH) ^b			
	Olmamış ^c	Zayıf ^c	Orta ^d	Güçlü ^d
Kontrol (distile su)	82,90 $\pm$ 0,08a	09,00 $\pm$ 0,004a	03,40 $\pm$ 0,25a	04,70 $\pm$ 0,310a
Kontrol (10% Etanol)	68,02 $\pm$ 0,04b	20,33 $\pm$ 0,060b	04,80 $\pm$ 0,17a	06,85 $\pm$ 0,100a
0.5	67,45 $\pm$ 0,01b	16,85 $\pm$ 0,020b	07,55 $\pm$ 0,07b	08,15 $\pm$ 0,190ab
1.0	66,00 $\pm$ 0,04b	17,05 $\pm$ 0,040b	03,80 $\pm$ 0,12a	13,15 $\pm$ 0,005b
1.5	69,34 $\pm$ 0,01b	15,64 $\pm$ 0,020b	05,18 $\pm$ 0,10ab	09,84 $\pm$ 0,140ab
2.0	76,20 $\pm$ 0,07ab	13,40 $\pm$ 0,210ab	05,10 $\pm$ 0,13ab	05,30 $\pm$ 0,220a

^a Her biri 5 larva ile yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

^b İstatistiki olarak önemli farklılıklar a-b harfleri ile belirtilmiştir. ($P > 0.05$, Tukey's HSD test^c, Tamhane T2^d).



Şekil 3.13. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde 4 saatlik melanizasyon durumuna etkisi

Aynı yöntemle 24 saat sonunda larvalardan disekte edilerek elde edilen Sephadex DEAE A-25 boncuklarının melanizasyon durumu Tablo 3.7 ve Şekil 3.14 gösterilmiştir. AZA'ya bağlı olarak melanizasyon durumlarında farklılık bulunmuştur.

Melanizasyon tepkimesinin gözlenmediği durumda en düşük veriler kontrol gruplarında gözlenmektedir. En yüksek yüzdeye sahip olan 2,0 µg/larva AZA uygulanan grupla 0,5 µg/larva AZA uygulanan grup arasındaki fark önemsizdir. Melanize olmama durumunun kontrol gruplarıyla kıyaslandığında yüksek olduğu 0,5 µg/larva AZA ile beslenen grubun hiçbir grupla arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı değildir. Melanize olmamış boncuk sayısı, kontrol gruplarında en düşük veriye sahiptir ($F= 0,568$; $df 5,12$; $P= 0,723$).

Zayıf melanizasyon durumu değerlendirildiğinde en düşük verinin 2,0 µg/larva doz uygulanan gruba ait olduğu gözlenmektedir. Bu grupla diğer tüm gruplar arasında fark gözlenmektedir. 2,0 µg/larva AZA, zayıf melanizasyonu azaltıcı etki göstermiştir ($F= 0,539$; $df 5,12$; $P= 0,743$).

Orta melanizasyon durumu değerlendirildiğinde 2,0 µg/larva AZA'da orta melanizasyon oldukça azalmıştır. Etanol ve 1,0 µg/larva AZA uygulamadan 24 saat sonra orta melanizasyonu arttırmıştır. Distile su uygulanan grupla 0,5 ve 1,5 µg/larva AZA uygulanan grupların arasında fark bulunmamıştır ($F= 3,957$; $df 5,12$; $P= 0,024$).

Güçlü melanizasyon durumunda da en düşük oran 2,0 µg/larva AZA ile beslenmiş grup olduğu gözlenmektedir. Bu grupla diğer gruplar arasındaki fark anlamlıdır. Distile su ile beslenen grupla 1,0 µg/larva AZA ile beslenen grup arasında fark mevcut değildir. Bu gruplarda güçlü melanizasyon durumu yüksektir ($F= 1,905$; $df 5,12$; $P= 0,167$).

Taşkıran (2016) yüksek lisans çalışmasında AZA'nın *G. mellonella* larvaları üzerindeki melanizasyonunu incelemiştir. Farklı dozlarda (100, 1000, 3000 ppm) AZA ile oluşturulan deney gruplarının yanı sıra işlem yapılmayan ve distile su uygulanan iki kontrol grubu oluşturulmuştur. Doza bağlı olarak melanizasyon tepkimesinde farklılıklar bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz AZA'nın *G. mellonella* larvalarında melanizasyonu etkilediği bulgusu desteklenmektedir.

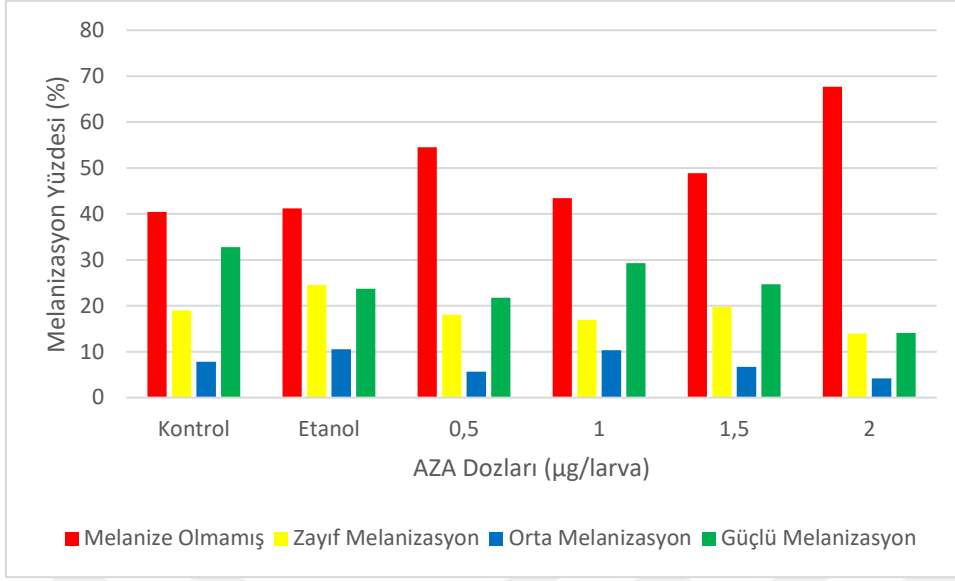
Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla GA₃ ile beslenen *G. mellonella* larvalarında melanizasyon durumunu inceleyen Altuntaş ve ark. (2012)'nin elde ettiği sonuçlar karşılaştırıldığında sonuçlar uyumluluk göstermektedir. 4 saatlik incelemede GA₃ dozuna bağlı olarak melanizasyon tepkimesi artış göstermiştir. Çalışmamızda da AZA'ya bağlı olarak 4. saatte melanize olmuş boncuk sayısında artma gözlenmiştir. Yapılan çalışmada 24 saatlik melanizasyonda GA₃ dozlarında azalma bulmuştur. Çalışmamızda 2,0 µg/larva AZA uygulanan grup en yüksek melanize olmamış boncuk sayısına sahiptir. Yaptığımız çalışmada 24 saatlik melanizasyon durumunun AZA'ya bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Grizanova ve ark. (2014)'nin yaptığı çalışmada *G. mellonella* larvalarına enjekte edilen *Bacillus thuringiensis*'e bağlı olarak melanizasyon tepkimesinde azalış olduğu kaydedilmiştir. Çalışmamız literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur.

Tablo 3.7. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde 24 saatlik melanizasyon durumuna etkisi

AZA Dozları (µg/larva)	Melanizasyon Durumu (% Ort. ^a ± SH) ^b			
	Olmamış	Zayıf	Orta	Güçlü ^c
Kontrol (distile su)	40.50 ± 0.07a	18.95 ± 0.07a	07.80 ± 0.12a	32.75 ± 0.03a
Kontrol (10% Etanol)	41.20 ± 0.10a	24.55 ± 0.13a	10.55 ± 0.20b	23.70 ± 0.03b
0.5	54.55 ± 0.08ab	18.05 ± 0.09a	05.65 ± 0.03a	21.75 ± 0.02b
1.0	43.45 ± 0.05a	16.95 ± 0.18a	10.30 ± 0.12b	29.30 ± 0.07a
1.5	48.85 ± 0.13a	19.75 ± 0.06a	06.75 ± 0.10a	24.65 ± 0.01b
2.0	67.73 ± 0.18b	13.93 ± 0.10b	04.21 ± 0.11c	14.13 ± 0.16c

^a Her biri 5 larva ile yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

^b İstatistiki olarak önemli farklılıklar a-b harfleri ile belirtilmiştir. (P>0.05, Tukey's HSD test, Tamhane T2^c).



Şekil 3.14. AZA'nın *G. mellonella* larva hemositlerinde 24 saatlik melanizasyon durumuna etkisi

4. SONUÇLAR

Tarımsal alanda zararlılarla mücadelede kimyasal yöntemlerin verdiği zararlardan dolayı gün geçtikçe doğal kökenli pestisit kullanımı artmaktadır. Böceklerle mücadelede ise biyoinsektisit madde olarak AZA ön plana çıkmaktadır. AZA'nın böcekler üzerindeki birçok zararlı etkisi bilinmektedir (Girish ve Shankara, 2008).

Yaptığımız çalışmada AZA'nın böcek bağışıklık sistemi üzerindeki etkisini ölçmek için model deney hayvanı olan *G. mellonella* kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde AZA dozuna bağlı olarak savunma sisteminde farklılıklar gözlenmiştir. AZA uygulanan bireylerde canlı hemosit sayılarındaki azalış ile geç apoptoz ve nekroz durumlarındaki artış AZA'nın böceklerde toksik olduğunu göstermektedir. Dere ve ark. (2015) çalışmalarında AZA'nın LD₅₀ değerini bulmuş ve AZA'nın *G. mellonella* üzerinde toksik etkisi olduğunu kanıtlamıştır.

4 saatte enkapsülasyon reaksiyonundaki artış savunma sisteminin direnç gösterdiğini belirtmektedir. 24 saatlik enkapsülasyon sonuçlarına göre AZA böceklerde hemositlerin enkapsüle etme yetilerini etkilememiştir. Bu sonuç böceklerde etken maddeye karşı zamanla tolerans gelişebileceğini göstermektedir. Canlı (2017) *G. mellonella* üzerinde TiO₂ nanopartikülleriyle yaptığı çalışmada 4 saatlik enkapsülasyonda doza bağlı değişiklik gözlemlemişken 24 saatlik enkapsülasyonda bir farklılık gözlemlememiştir.

Böceklerde hücresel savunma sisteminin yapı taşları hemositlerdir. Böcekler yabancı ve zararlı bir maddeye karşı hemositlerin ortak bir çalışmasıyla kendilerini korurlar (Wiesner ve Götz, 1993; Xylander, 2009). Çeşitli yöntemlerle savunmada görev alan hemositlerin çalışma mekanizmasında AZA'nın toksik etkisinin bulunduğu vurgulandığı bu çalışma ileri düzey moleküler çalışmalarla geliştirilerek AZA'nın hangi mekanizmaları etkileyerek savunma sisteminde zayıflık meydana getirdiği açıklanabilir. Çalışmamızda hemosit incelemeleri hem enkapsülasyon ve melanizasyon açısından hem de apoptoz, nekroz, mitotik indeks ve mikronukleus oluşumu açısından geniş çapta incelenmiştir.

Çalışmamız kapsamında incelenen mitotik indeks sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen verilen önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Hemositlerdeki mitotik

indeks %1 ila %8 arasında değişmektedir (Beaulaton, 1979). Tüm AZA dozlarında artış gözlenmekle birlikte en düşük dozda istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenmiştir. Çalışma sonucuna göre AZA *G. mellonella* larvalarında hücre döngüsünü arttırmaktadır.

nceki alışmalar dikkate alındığında birçok pestisitinin genotoksik etkileri olduğu gözlenmektedir (Gonzlez,2011). AZA uygulamasında doza bağlı olarak mikronukleus oluşumunda artış gözlenmiştir ve sonuçlar daha önceki çalışmalarla tutarlılık göstermektedir. Özellikle yüksek dozların DNA hasarını daha fazla arttırdığı ve mikronuklus oluşumuna sebep olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda kontrol grubu olarak AZA'nın çözücüsü olan etanol ve distile su kullanılmıştır. AZA dozlarıyla bu iki kontrol grubu arasında birçok reaksiyonda farklılık mevcuttur. Aynı zamanda 4 saatlik melanizasyon durumu incelendiğinde distile su uygulanan grupla etanol uygulanan grup arasında da fark olması etanolün *G. mellonella* larvalarında bir takım toksik etkisi olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Dere ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada distile su ve etanol olmak üzere iki kontrol grubu oluşturmuş ve elde ettiği sonuçlara göre etanol distile su ile aynı etkilyi göstermeyerek *G. mellonella* larvaları üzerinde toksik etki oluşturmuştur. Çalışmalardaki benzerlik gelecek çalışmalarda etanolün böceklerde bağışıklık sistemine etkilerinin araştırılmasına n açabilir.

Sonuç olarak çalışmamızın, böcek bağışık sistemi ve genotoksisite ile ilgili gelecek çalışmalarda kullanılabilecek bir veri olarak değerlendirip literatüre katkı sağlayacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Akyol E., Yeninar H., Şahinler N., Ceylan D.A. (2009) Büyük Balmumu Güvesi *Galleria mellonella* L.'nın (Lepidoptera: Pyralidae) Kontrolünde Karbondioksitin (CO₂) Kullanımı. Uludağ Arıcılık Dergisi, 9 (1), 26-31.
- Akyol, E. (2013) Mum Güvesi (*Galleria mellonella* L.) Zararı ve Kontrol Yöntemleri. Arıcılık Araştırma Dergisi, 9, 2-7.
- Altınççek, B., Lindner, M., Linder, D., Preissner, K., Vilcinskas, A. (2007) Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. Infection and Immunity, 75 (1), 175-183.
- Altuntaş H. (2011) Gibberellik asit (GA₃)'in Konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ve Parazitoit *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Hemolenf Kimyası ve Hemositlerine Etkisi. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye.
- Altuntaş H., Kılıç A. Y., Uçkan F., Ergin E. (2012) Effects of Gibberellic Acid on Hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Environmental Entomology, 41, 688-696.
- Beaulaton, J. (1979) Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms. Biochimie, 61, 157-164.
- Beckage N.E., Jeanette S.M., Nielsen B.D., Nesbit D.J. (1988) Disruptive Effects of Azadirachtin on Development of *Cotesia congregata* in Host Tobacco Hornworm Larvae. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 9, 47-65.
- Bergin D., Murphy L., Keenan J., Clynes M., Kavanagh K. (2006) Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. Microbes and Infection, 8, 2105-2112.
- Bezzar-Bendjazia R., Kilani-Morakchi S., Aribi N. (2016) Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. Pesticide Biochemistry and Physiology, (In Press).

- Blanco L. A. A., Crispim J. S., Fernandes K. M., Oliveira L. L., Pereira M. F., Bazzolli D. M. S., Martins G. F. (2017) Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cell and Tissue Research, 370(1), 153-168
- Boman H.G., Faye I., Gudmundsson G.H., Lee J.Y., Lidholm D.A. (1991) Cell free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial proteins. European Journal of Biochemistry, 201, 23-31.
- Brey P.T., Lee W.J., Yamakawa M., Koizumi Y., Perrot S. (1993) Role of the integument in insect immunity: Epicuticular abrasions and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90, 6275-6279.
- Brodeur J., Vet L.E.M. (1995) Relationships between parasitoid host range and host defence: a comparative study of egg encapsulation in two related parasitoid species. Physiological Entomology, 20, 7-12.
- Bronskill J. (1961) A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Lepidopterists' Society, 15, 102-104.
- Bröker L.E., Krüyt F.A.E., Giaccone G. (2005) Cell Death Independent of Caspases: A Review. Clinical Cancer Research, 11(9), 3155-3162.
- Butterworth J.H., Morgan E.D. (1968) Isolation of a Substance that suppresses Feeding in Locusts. Chemical Communications, 23-24.
- Butterworth J. H., Morgan E.D. (1971) Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, *Azadirachta indica*. Journal of Insect Physiology, 17, 969-977.
- Büyükgüzel E., Kalender Y. (2009) Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 94, 112-118.
- Canlı G. (2017) Titanyum Dioksit (TiO₂) Nanopartikülünün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Gelişimine ve Hemositlerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

- Cendoroglo, M., Jaber, B., Balakrishnan, L., Perianayagam, V.S., King, M., Pereira, B.J.G. (1999) Neutrophil Apoptosis and Dysfunction in Uremia. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10, 93-100.
- Charbonneau, C., Cote, R., Charpentier, G. (2007) Effects of azadirachtin and of simpler epoxy-alcohols on survival and behaviour of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Journal of Applied Entomology*, 131(7), 447-452.
- Charrière, J.D., Imdorf, A. (1997) Protection of Honeycombs from Moth Damage. Swiss Bee Research Center Federal Dairy Research Station, Communication, 24, 1-16.
- Choi J.Y., Whitten M.M.A., Cho M.Y., Lee K.Y., Kim M.S. Ratcliffe N.A., Lee B.L. (2002) Calreticulin enriched as an early-stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae. *Developmental and Comparative Immunology*, 26, 335-343.
- Constantinou C., Papas K. A., Constantinou A. I. (2009) Caspase-Independent Pathways of Programmed Cell Death: The Unraveling of New Targets of Cancer Therapy? *Current Cancer Drug Targets*, 9, 717-728.
- Çelik D. (2014) Konağa Verilen İndol-3 Asetik Asit'in Konak *Achoria grisella* Fabricius, 1794 (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) Hemmositlerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye.
- Daffre S., Kylsten P., Samakovlis C. ve Hultmark D. (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Molecular & General Genetics*, 242, 152–162.
- Darakhshan S., Ghanbari A. (2013) Tranilast enhances the anti-tumor effects of tamoxifen on human breast cancer cells in vitro. *Journal Of Biomedical Science*. 20 (76), 1-13.
- De Jussieu A. (1830) *Memoires du Museum d'Histoire Naturelle*, Paris, 19, 220.
- Dere B., Altuntaş H., Nurullahoğlu U (2015) Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 83(3), 138-152.

- Dorn A., Rademacher J.M., Sehn E. (1986) Effects of Azadirachtin on the Moulting Cycle, Endocrine System and Ovaries in Last-Instar Larvae of the Milkweed Bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of Insect Physiology*, 32, 231-238.
- Dubovskiy I. M., Kryukova N. A., Glupov V. V., Ratcliffe N. A. (2016) Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 13, 229-246.
- Er A. (2011) Endoparazitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae) Zehiri ve Parazitlenmesinin Konak Hemositlerine Etkileri. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Balıkesir, Türkiye.
- Er A., Uçkan F., River D. B., Sak O. (2011) Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid *Pimpla turionellae* on hemocytes of the host *Galleria mellonella*. *Journal of Applied Entomology*, 136, 225-236.
- Er A., Taşkiran D., Sak O. (2017) Azadirachtin-induced effects on various life history traits and cellular immune reactions of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Biological Sciences*, 69(2), 335-344.
- Eskin A. (2017) Çinko Oksit (ZnO) ve Gümüş (Ag) Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) Üzerindeki Toksik Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Fauvarque M. O.; Williams M. J. (2011) *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *Journal of Cell Science*, 124, 1373-1382.
- Fındıklı Z., Türkoğlu Ş. (2010) Glyphos ve DDVP'nin *Allium cepa* L.'da Mitoz Bölünme ve Kromozomlar Üzerine Etkisi. *Fen Bilimleri Dergisi*, 31 (2), 49-62.
- Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Temmpestini A., Orlandini G.E., Capaccioli S., Zecchi Orlandini S. (2000) Aponecrosis: Morphological and Biochemical Exploration of a Syncretic Process of Cell Death Sharing Apoptosis and Necrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 182,41-49.
- Gagen S. J., Ratcliffe N.A. (1976) Studies on the in Vivo Cellular Reactions and Fate of Injected Bacteria in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 28, 17-24.

- Gelbic I., Nemec V. (2001) Developmental changes caused by metyrapone and azadirachtin in *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae) and *Galleria mellonella* (L.) (Lep., Pyralidae). Journal of Applied Entomology, 125, 417-422.
- Girish, K., Shankara Bhat, S. (2008) Neem—a green treasure. Electronic Journal of Biology, 4(3), 102-111.
- González N. V., Nikoloff N., Soloneski S., Larramendy M. L. (2011) A combination of the cytokinesis micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. Toxicology Letters, 207(3), 204-12.
- Göçmen H., Topakçı N., İkten C. (2007) Pamuk Beyazsineği, *Bemisa tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae)’ye Karşı Azadirachtin’in Etkinliği Üzerine Bir Araştırma. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 20 (1), 119-126.
- Green D.G., Reed J.C. (1998) Mitochondria and Apoptosis. Science, 281, 1309-1312.
- Grizanov E. V., Dubovskiy I. M., Whitten M. M. A., Glupov V. V. (2014) Contributions of Cellular and Humoral Immunity of *Galleria mellonella* Larvae in Defence Against Oral Infection by *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology, 119, 40–46.
- Güleş Ö., Eren Ü. (2008) Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 73-78.
- Hall D. W. (1983) Mosquito Hemocytes: A Review. Developmental and Comparative Immunology, 7, 1-12.
- Haubruge E., Seck D., Angelini M., Hemptinne J.L., Larew H.G., Gaspar C. (1994) Growth-inhibiting effects of a neem- based insecticide (Margosan-O) against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Insect Science and its Application, 15(4/5), 415-420.
- Huang Z., Shi P., Dai J., Du J. (2004) Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. Pesticide Biochemistry and Physiology, 80, 85–93.
- Huang J.F., Shui K.J., Li H.Y., Hu M.Y., Zhong G.H. (2011) Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* SI-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53. Pesticide Biochemistry and Physiology, 99, 16-24.

Ishimo H., Kitamoto T. (2010) The Steroid Molting Hormone Ecdysone Regulates Sleep in Adult *Drosophila melanogaster*. Genetics Society of America, 185, 269- 281.

Isman M.B., Koul, O., Luczynski A., Kaminski J. (1990) Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38, 1406-1411.

Junqueira J. C. (2012) *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. Virulence, 3(6), 474- 476.

Kaya., S. (2015) Konağa Verilen indol-3-asetik asitin ve Kaliks Sıvısının Konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ve Parazitoid *Pimpla turionella* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Hemositlerine Etkisi. Doktora Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, Türkiye.

Kosmider, B., Zyner, E., Osiecka, R., Ochocki, J. (2004) Induction of Apoptosis and Necrosis in A549 Cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in Comparison with cis-DDP. Mutation Research, 563, 61-70.

Kurt D., Kayış T. (2015) Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*. Turkish Journal of Zoology, 39, 452-457.

Lackie A. M. (1988) Haemocyte Behaviour. Advances in Insect Physiology, 21, 85-17.

Lai D., Jin X., Wang H., Yuan M., Xu H. (2014) Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin. Journal of Biotechnology, 185, 51–56.

Lavine M.D., Strand M.R. (2001) Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudaletia includens*. Journal of Insect Physiology, 47, 965-974.

Levin D.M., (2007) An Integrin Required for the Encapsulation Immune Response in the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae), Kansas State University, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas.

Lowery D. T., Isman M. B. (1995) Toxicity of neem to natural enemies of aphids. Phytoparasitica, 23(4), 297-306.

- Malczewska M., Gelman D. B., Cymborowski B. (1988) Effect of Azadirachtin on Development Juvenile Hormone and Ecdysteroid Titres in Shelled *Galleria mellonella* Larvae. *Journal of Insect Physiology*, 34(7), 725-732.
- Marmaras J. V., Lampropoulou M., (2009) Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling*, 21: 186-195.
- Meena R., Kumar S., Paulraj R. (2015) Titanium oxide (TiO₂) nanoparticles in induction of apoptosis and inflammatory response in brain. *Journal of Nanoparticle Research*, 17,49.
- Menze M. A., Fortner G., Nag S., Hand S. C. (2010) Mechanisms of apoptosis in Crustacea: what conditions induce versus suppress cell death? *Apoptosis*, 15, 293-312.
- Miller F., Uetz A. (1998) Evaluating Biorational Pesticides for Controlling Arthropod Pests and Their Phytotoxic Effects on Greenhouse Crops. *HortTechnology*, 8(2), 185-192.
- Murthy B. N. S., Saxena P. K. (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Plant Cell Reports*, 17, 469-475.
- Nainu F., Tanaka Y., Shiratsuchi A., Nakanishi Y. (2015) Protection of Insects against Viral Infection by Apoptosis-Dependent Phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 1-11.
- Nappi A. J., Ottaviani E. (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*, 22, 469-480.
- Nation J. L. (2002) *Insect Physiology and Biochemistry*, CRC press, Boca Raton, London, Newyork, Washington.
- Öcal A. (2012) İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde *Hypericum Heterophyllum* Vent. Türünün Mikronukleus, Mitotik İndeks ve Replikasyon İndeksi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Bozok Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yozgat, Türkiye.
- Özer, M. (1961) Arı Kovanlarında Önemli Zarar Yapan Bal Mumu Güvesinin (*Galleria mellonella*) Morfoloji, Biyoloji ve Yayılışı Üzerinde Araştırmalar. Tarım Bakanlığı, Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü, Bitki Koruma Bölümü, 2(12), 26-35.
- Pech L.L.; Strand M.R. (1996) Granular cells are required for encapsulation of foreign

targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science*, 109, 2053-2060.

Perveen N., Ahmad M. (2016) Toxicity of some insecticides to the haemocytes of giant honeybee, *Apis dorsata* F. under laboratory conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, (*In Press*).

Pimentel D., Levitan L. (1986) Pesticides: Amounts Applied and Amounts Reaching Pests. *BioScience*, 36(2), 86-91.

Qiang X., Hongxia S., Xinhun H., Yinghua S., Dexiang G., Guren Z. (2005) Apoptosis of *Spodoptera litura* larval hemocytes induced by heavy metal zinc. *Chinese Science Bulletin*, 50 (24), 2856-2860.

Raj A. (2014) Toxicological Effect of *Azadirachta Indica*. *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*, 2(9), 29-33.

Ramarao N., Leroux C. H., Lereclus D. (2012) The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments*, 70, 1-7.

Rharrabe K., Amri H., Bouyad N., Sayah F. (2008) Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research*, 44, 290– 29.

Rhee W. J., Kim E. J., Park T. H. (2002) Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295, 779-783.

Ribeiro C., Brehélin M (2006) Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, 52, 417-429.

Richards E. H., 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.

Richards, E. H., Dani M. P. (2008) Biochemical Isolation of an Insect Haemocyte Anti-aggregation Protein from the Venom of the Endoparasitic Wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and Identification of Its Gene. *Journal of Insect Physiology*, 54, 1041-1049.

Rosales C. (2011) Phagocytosis, a Cellular Immune Response in Insects. *Invertebrate Survival Journal*, 8, 109-131.

Sak O. (2004) Cypermethrinin *Pimpla turionellae* L. (Hym.; Ichneumonidae), Toplam Protein, Lipit ve Karbonhidrat Miktarı ile Hemositlerine Etkisi. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Türkiye.

Sak O., Uçkan F., Ergin E. (2006) Effects of Cypermethrin on Total Body Weight, Glycogen, Protein and Lipid Contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Belgian Journal of Zoology*, 136(1), 53-58.

Sak O., Uçkan F. (2009) Cypermethrinin *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Puplaşma ve Ölüm Oranlarına Etkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 9(3), 88-96.

Sayah F., Fayet C., Idaomar M., Karlinsky A. (1996) Effect of Azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect Dermaptera). *Tissue&Cell*, 28(6), 741-749.

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.

Sezer B., Ozalp P. (2011) The Effects of Azadirachtin on The Percentage of Glycogen Contents in Larvae of *Galleria mellonella*. *Ekoloji*, 20(81), 67-72.

Sideri M., Tsakas S., Markoutsia E., Lampropoulou M., Marmaras V.J. (2007) Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology*, 123, 528-537.

Smith T. L. (1965) External Morphology of The Larva, Pupa, And Adult of The Wax Moth, *Galleria mellonella* L. *Journal of The Kansas Entomological Society*, 38, 287-310.

Spollen K. M., Isman M. B. (1996) Acute and Sublethal Effects of a Neem Insecticide on the Commercial Biological Control Agents *Phytoseiulus persimilis* and *Amblyseius cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) and *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal Of Economic Entomology*, 89(6), 1379-1386.

SPSS (2010) Inc., SPSS 20.0 Statistics. SPSS, Chicago, IL.

Takaki K., Higuchi Y., Hashii M., Ogino C., Shimizu N. (2013) Induction of apoptosis

associated with chromosomal DNA fragmentation and caspase-3 activation in leukemia L1210 cells by TiO₂ nanoparticles. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1-5.

Taşkıran D. (2016) Azadirachtin'in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'da Hemositler Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Türkiye.

Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O. (2002) The coagulation of insect hemolymph. Cellular and Molecular Life Sciences, 59, 363-372.

Tunaz H. (2004) Böceklerde Bağışıklık Mekanizması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 7(2), 78-82.

Turnbull M. W., Martin S.B., Webb B.A. (2004) Quantitative analysis of hemocyte morphological abnormalities associated with *Campoletis sonorensis* parasitization. Journal of Insect Science, 4(11), 1-15.

Uçkan F., Sak O. (2010) Cytotoxic Effect of Cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Larval Hemocytes. Ekoloji, 19(75), 20-26.

Üstüner D. (2011) Kromozom Kırıkları ve Mikronükleus-Apoptoz Bağlantısı. Tubav Bilim Dergisi, 4(1), 64-69.

Vilmos P., Kurucz E. (1998) Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Immunology Letters, 62, 59-66.

Wani T. A., Masoodi F. A., Wani I. A. (2017) The possible nomenclature of encapsulated products. Food Chemistry, 234, 119-120.

Wiegand C., Levin D., Gillespie J.P., Willott E., Kanost M.R., Trenczek T. (2000) Monoclonal Antibody MS13 Identifies a Plasmacyte Membrane Protein and Inhibits Encapsulation and Spreading Reactions of *Manduca sexta* Hemocytes. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 45, 95-108.

Wiesner A., Götz P. (1993) Silica Beads Induce Cellular and Humoral Immune Responses in *Galleria mellonella* Larvae and in Isolated Plasmacytes, Obtained by a Newly Adapted Nylon Wool Separation Method. Journal of Insect Physiology, 39(10), 865-876.

Williams L.A.D., Mansingh A. (1996) The insecticidal and acaricidal actions of

compounds from *Azadirachta indica* (A. Juss.) and their use in tropical pest management. Integrated Pest Management Reviews, 1, 133-145.

Wojda I., Jakubowicz T. (2007) Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. Journal of Insect Physiology, 53, 1134-1144.

Wojda I., Kowalski P., Jakubowicz T. (2009) Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. Journal of Insect Physiology, 55, 525-531.

Wojda I. (2016) Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. Insect Science, 00,1-16.

Wu G., Liu Y., Ding Y., Yi Y. (2016) Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. Tissue and Cell, 48, 297-304.

Xylander W. (2009) Hemocytes in Myriapoda (Arthropoda): a review. Invertebrate Survival Journal, 6, 114-124.

Yılmaz E. (2013) Farklı dozlardaki Alüminyum Klorür'ün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Biyolojisine ve Hemositlerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eda CANSU

Doğum yeri ve Tarihi : Nilüfer / 09.04.1993

Yabancı Dil : İngilizce

E-posta : edamiaj@gmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite/ Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen Bilimleri	Eşref Bitlis Lisesi	2011
Üniversite	Biyoloji Bölümü	Marmara Üniversitesi	2015

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

Nurulloğlu Z.U., Cansu E. (2018) Effects of Azadirachtin on the Encapsulation Reaction in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 26-27 April 2018. Ankara, Turkey.

Nurulloğlu Z.U., Cansu E. (2018) Effects of Azadirachtin on the Melanization Reaction in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 26-27 April 2018. Ankara, Turkey.