

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ENDOPARAZİTOİT *Pimpla turionellae* (L.) (HYMENOPTERA;  
ICHNEUMONIDAE) ZEHİRİ VE PARAZİTLEMESİNİN KONAK  
HEMOSİTLERİNE ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Aylin ER**

**Balıkesir, Ocak - 2011**

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ENDOPARAZİTOİT *Pimpla turionellae* (L.) (HYMENOPTERA;  
ICHNEUMONIDAE) ZEHİRİ VE PARAZİTLEMESİNİN KONAK  
HEMOSİTLERİNE ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Aylin ER**

**Balıkesir, Ocak - 2011**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



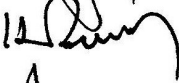

ENDOPARAZİTOİT *Pimpla turionellae* (L.) (HYMENOPTERA;  
ICHNEUMONIDAE) ZEHİRİ VE PARAZİTLEMESİNİN KONAK  
HEMOSİTLERİNE ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Aylin ER

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN

Sınav Tarihi: 24.01.2011

Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN (Danışman-KOÜ)   
Prof. Dr. Gürsel ERGEN (EÜ)   
Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ (ÇOMÜ)   
Doç. Dr. Hatice TORCU KOÇ (BAÜ)   
Yrd. Doç. Dr. Olga SAK (BAÜ) 

Balıkesir, Ocak – 2011

“Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2007/49 Kodlu proje ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

“Bu alışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından TBAG/2006 - 106T255 Nolu proje ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

## ÖZET

### ENDOPARAZİTOİT *Pimpla turionellae* (L). (HYMENOPTERA; ICHNEUMONIDAE) ZEHİRİ VE PARAZİTLEMESİNİN KONAK HEMOSİTLERİNE ETKİLERİ

Aylin ER

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi / Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN

Balıkesir, 2011

İdiobiont, soliter ve pup endoparazitoiti *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae)'nın, konak tür büyük balmumu güvesi, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae) kullanılarak yetiştirilmesinde ve deneyler boyunca laboratuarda  $25 \pm 2$  °C sıcaklık,  $\% 60 \pm 5$  nispi nem ve 12:12 (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot şartları sağlandı. Tez kapsamında parazitoit zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin konak toplam ve farklı hemosit sayılarına, dolaşımdaki hemositlerde apoptotik ve mitotik indekse, hemositlerin enkapsülasyon ve melanizasyon tepkilerine etkileri belirlendi.

Parazitlenme ve deneysel olarak *P. turionellae* zehirine maruz kalan *G. mellonella* pupunda dolaşımdaki toplam hemosit sayıları hiçbir işleme tabi tutulmamış puplara göre  $\% 50$ 'den fazla azalma gösterdi. Larval evrede ise yüksek zehir dozları enjeksiyonunu takiben toplam hemosit sayılarında önemli azalmalar gözlenirse de düşük zehir dozlarında anlamlı azalmalar olmadı. *G. mellonella* larva ve pupunda hemositlerin yarısından fazlasını granülositlerin oluşturduğu, ikinci yoğun hücre tipinin plazmatositler olduğu gözlemlendi. Parazitlenme ve yüksek zehir dozları enjeksiyonu ilk 4 saatlik dönemde granülositlerin sayısında azalmaya neden olurken, plazmatositlerin sayısını artırdı.

*G. mellonella* larval ve pupal evrelerinde erken ve geç apoptotik hemositlerin oranı parazitlenme ve yüksek zehir dozları enjeksiyonlarına bağlı olarak artma gösterdi. Zıt olarak nekrotik hemositlerde artış pupal evrede sadece parazitlenmiş gruplarda 24 saatlik periyotta gözlenirken larval evrede farklılık bulunamadı. *P. turionellae* parazitlenmesi ve yüksek zehir dozları enjeksiyonunun konak hemositlerinde mitotik indekste azalmaya neden olduğu tespit edildi. Konak içerisine enjekte edilen Sephadex A-25 boncuklarının analizi, yüksek zehir dozlarının pupal ve larval evrede güçlü enkapsüle olmuş ve melanize olmuş boncukların oranını  $\% 50$ 'den fazla azalttığını gösterdi. Benzer etkinin parazitlenmiş gruplarda da gözlenmesi *P. turionellae* tarafından parazitlemenin konak *G. mellonella*'da hemosit aracılı enkapsülasyon tepkilerini büyük oranda baskıladığını göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Pimpla turionellae* / zehir / toplam ve farklı hemosit sayısı / apoptozis / mitotik indeks / enkapsülasyon / melanizasyon.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF PARASITISM AND VENOM FROM THE ENDOPARASITOID *Pimpla turionellae* (L.) (HYMENOPTERA; ICHNEUMONIDAE) ON HEMOCYTES OF THE HOST

Aylin ER

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

Ph. D. Thesis / Supervisor: Ass. Prof. Dr. Fevzi UÇKAN

Balıkesir-Turkey, 2011

Experiments and cultivation of the idiobiont solitary pupal endoparasitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) on the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) were conducted in a laboratory at  $25 \pm 2$  °C,  $60 \pm 5$  % relative humidity and a photoperiod of 12:12 h (Light: Dark). The effects of parasitoid venom injection and parasitism on total and differential hemocyte counts of the host, apoptotic and mitotic indices in the circulating hemocytes, and encapsulation and melanization responses of the hemocytes were investigated within the thesis.

The number of total hemocytes in the circulation decreased more than 50 % in the parasitized and experimentally venom injected *G. mellonella* pupae when compared to untreated ones. Total hemocyte counts significantly decreased in larvae injected with high doses of venom however hemocyte counts did not indicate a considerable change at low venom doses. In *G. mellonella* larvae and pupae, the major hemocyte type was the granular cells, and plasmatocytes were the next frequent hemocyte type observed. In *G. mellonella* injected with higher doses of venom and parasitized, the number of granulocytes decreased however the ratio of plasmatocytes increased at 4 h post treatments.

The ratio of early and late apoptotic hemocytes increased in *G. mellonella* pupae and larvae upon parasitization and at high doses of venom injection. However, an increase in necrotic hemocytes was only observed in parasitized pupae at 24 h and no difference was observed in larvae. The mitotic indices of host hemocytes decreased upon parasitization and at high doses of venom. Analysis of Sephadex A-25 beads injected into the host revealed that the number of beads strongly encapsulated and melanized reduced by more than 50 % at high doses of venom injection into pupae and larvae. Similar results were also obtained in parasitized pupae indicating that parasitization by *P. turionellae* suppressed hemocyte-mediated encapsulation substantially in *G. mellonella*.

**KEY WORDS:** *Pimpla turionellae* / venom / total and differential hemocyte count / apoptosis / mitotic indices / encapsulation / melanization.

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET, ANAHTAR KELİMELER</b>	iv
<b>ABSTRACT, KEY WORDS</b>	v
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	viii
<b>TABLO LİSTESİ</b>	x
<b>ÖNSÖZ</b>	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1 Böceklerde Bağışıklık sistemi	4
1.1.1 Humoral Bağışıklık	5
1.1.2 Hücresel Bağışıklık	8
1.1.3 Hemosit Aracılı Bağışıklık Tepkileri	12
1.1.3.1 Fagositoz	12
1.1.3.2 Nodül Oluşumu	13
1.1.3.3 Enkapsülasyon	14
1.2 Parazitoitlerin Konak Bağışıklık Tepkilerinden Korunması	16
<b>2. MATERYAL VE METOT</b>	25
2.1 Konak Kültürleri	25
2.2 Parazitoit Kültürleri	26
2.3 <i>G. mellonella</i> Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi	26
2.4 <i>P. turionellae</i> zehir dozlarının oluşturulması, enjeksiyonu ve parazitleme	27
2.5 <i>P. turionellae</i> zehiri ve parazitlemesinin konak toplam hemosit sayısına etkileri	29
2.6 <i>P. turionellae</i> zehiri ve parazitlemesinin konak farklı hemosit sayısına etkileri	32
2.7 <i>P. turionellae</i> zehiri ve parazitlemesinin konak hemositlerinde apoptotik indekse etkileri	33
2.8 <i>P. turionellae</i> zehiri ve parazitlemesinin konak hemositlerinde mitotik indekse etkileri	35
2.9 <i>P. turionellae</i> zehiri ve parazitlemesinin konak hemositlerinde in vivo enkapsülasyon ve melanizasyona etkileri	35
2.10 İstatistik	37
<b>3. BULGULAR</b>	38
3.1 <i>G. mellonella</i> 'da hemosit tipleri	38
3.2 <i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonu ve parazitlemesinin konak <i>G. mellonella</i> pupu toplam hemosit sayılarına etkileri	42



3.3	<i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonunun konak <i>G. mellonella</i> larvası toplam hemosit sayılarına etkileri	45
3.4	<i>P. turionellae</i> zehiri ve parazitlemesinin konak <i>G. mellonella</i> pupu farklı hemosit sayılarına etkileri	47
3.5	<i>P. turionellae</i> zehirinin konak <i>G. mellonella</i> larvası farklı hemosit sayılarına etkileri	54
3.6	<i>P. turionellae</i> zehiri ve parazitlemesinin konak <i>G. mellonella</i> pupunda apoptotik indekse etkileri	60
3.7	<i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonunun konak <i>G. mellonella</i> larvasında apoptotik indekse etkileri	68
3.8	<i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonu ve parazitlemesinin konak <i>G. mellonella</i> pupunda mitotik indekse etkileri	76
3.9	<i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonunun konak <i>G. mellonella</i> larvasında mitotik indekse etkileri	79
3.10	<i>P. turionellae</i> zehiri ve parazitlemesinin konak <i>G. mellonella</i> pupal hemositlerinde in vivo enkapsülasyona etkileri	82
3.11	<i>P. turionellae</i> zehiri ve parazitlemesinin konak <i>G. mellonella</i> larval hemositlerinde in vivo enkapsülasyona etkileri	88
3.12	<i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonu ve parazitlemesinin konak <i>G. mellonella</i> pupal hemositlerinde in vivo melanizasyona etkileri	91
3.13	<i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonunun konak <i>G. mellonella</i> larval hemositlerinde in vivo melanizasyona etkileri	93
	<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	95
	<b>5. KAYNAKLAR</b>	113

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 2.1	Neubauer Hemositometre Lamı	31
Şekil 2.2	Neubauer hemositometresi sayım alanı	32
Şekil 3.1	<i>G. mellonella</i> son evre larvasında plazmatositler.	38
Şekil 3.2	<i>G. mellonella</i> son evre larvasında granülositler	39
Şekil 3.3	<i>G. mellonella</i> son evre larvasında Prohemosit (a), Sferülositler (b), (c)	39
Şekil 3.4	<i>G. mellonella</i> son evre larvasında önositoidler	40
Şekil 3.5	<i>G. mellonella</i> pup evresinde plazmatositler	40
Şekil 3.6	<i>G. mellonella</i> pup evresinde granülositler	41
Şekil 3.7	<i>G. mellonella</i> pup evresinde (a) Prohemosit, (b) Sferülosit	41
Şekil 3.8	<i>G. mellonella</i> larvasında granülosit (gri ok), plazmatositler (siyah ok), önositoid (beyaz ok), sferülositler (beyaz ok ucu), prohemosit (siyah ok ucu)	41
Şekil 3.9	KEZ dozlarının ve parazitlemenin farklı zaman dönemlerinde konak pupu toplam hemosit sayılarına etkileri	44
Şekil 3.10	KEZ dozlarının farklı zaman dönemlerinde konak larvası toplam hemosit sayılarına etkileri	48
Şekil 3.11	KEZ dozlarının ve parazitlemenin farklı zaman dönemlerinde konak pupu granülosit oranlarına etkileri	50
Şekil 3.12	KEZ dozlarının ve parazitlemenin farklı zaman dönemlerinde konak pupu plazmatosit oranlarına etkileri	53
Şekil 3.13	KEZ dozlarının ve parazitlemenin farklı zaman dönemlerinde konak pupu diğer hücre oranlarına etkileri	53
Şekil 3.14	KEZ dozlarının farklı zaman dönemlerinde konak larvası granülosit oranlarına etkileri	56
Şekil 3.15	KEZ dozlarının farklı zaman dönemlerinde konak larvası plazmatosit oranlarına etkileri	59
Şekil 3.16	KEZ dozlarının farklı zaman dönemlerinde konak larvası diğer hücre oranlarına etkileri	59
Şekil 3.17	Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış <i>G. mellonella</i> pupal hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri	61
Şekil 3.18	<i>G. mellonella</i> pup evresinde erken apoptotik bir hemosit	61
Şekil 3.19	<i>G. mellonella</i> pup evresinde erken apoptotik bir hemosit	62
Şekil 3.20	<i>G. mellonella</i> pup evresinde geç apoptotik bir hemosit	62
Şekil 3.21	<i>G. mellonella</i> pup evresinde nekrotik bir hemosit	63
Şekil 3.22	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 4 saatlik dönemde konak pupu apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları	66
Şekil 3.23	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 8 saatlik dönemde konak pupu apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları	66
Şekil 3.24	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 24 saatlik dönemde konak pupu apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları	67

Şekil 3.25	Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış <i>G. mellonella</i> larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri	68
Şekil 3.26	Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış <i>G. mellonella</i> larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri	69
Şekil 3.27	<i>G. mellonella</i> larva evresinde erken apoptotik hemositler	69
Şekil 3.28	<i>G. mellonella</i> larva evresinde erken apoptotik bir hemosit	70
Şekil 3.29	<i>G. mellonella</i> larva evresinde geç apoptotik bir hemosit	70
Şekil 3.30	<i>G. mellonella</i> larva evresinde nekrotik hemositler	71
Şekil 3.31	Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 4 saatlik dönemde konak larvası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları	73
Şekil 3.32	Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 8 saatlik dönemde konak larvası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları	74
Şekil 3.33	Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 24 saatlik dönemde konak larvası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları	74
Şekil 3.34	<i>G. mellonella</i> pupal dönemde mitoz evresinde hemositler	77
Şekil 3.35	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> pupunda mitoz evresindeki hemositlerin oranları	78
Şekil 3.36	<i>G. mellonella</i> larval dönemde mitoz evresinde hemositler	80
Şekil 3.37	<i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larvasında mitoz evresindeki hemositlerin oranları (%)	82
Şekil 3.38	<i>G. mellonella</i> 'da A) Enkapsüle olmamış, B) Zayıf enkapsüle olmuş, C) Güçlü enkapsüle olmuş DEAE Sephadex A-25 Boncukları	85
Şekil 3.39	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> pup evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	87
Şekil 3.40	Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	90
Şekil 3.41	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> pup evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	92
Şekil 3.42	Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	94

## TABLO LİSTESİ

Tablo Numarası	Adı	Sayfa
Tablo 3.1	Zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin <i>G. mellonella</i> pupu toplam hemosit sayılarına ( $\times 10^6$ hücre/ml) etkileri	43
Tablo 3.2	Farklı deney grupları, zaman ve etkileşimlerinin <i>G. mellonella</i> pupu toplam hemosit sayılarına etkilerini gösteren ANOVA tablosu	45
Tablo 3.3	Zehir enjeksiyonunun <i>G. mellonella</i> son evre larvası toplam hemosit sayılarına ( $\times 10^6$ hücre/ml) etkileri	46
Tablo 3.4	Farklı deney grupları (kontrol ve zehir enjekte edilmiş), zaman ve etkileşimlerinin <i>G. mellonella</i> son evre larvası toplam hemosit sayılarına etkilerini gösteren ANOVA tablosu	47
Tablo 3.5	Zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin <i>G. mellonella</i> pupunda granülosit sayılarına (Granülosit/1000) etkileri	49
Tablo 3.6	Zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin <i>G. mellonella</i> pupunda plazmatosit sayılarına (Plazmatosit/1000) etkileri	51
Tablo 3.7	Zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin <i>G. mellonella</i> pupunda diğer hemosit tipleri sayılarına (DH/1000) etkileri	52
Tablo 3.8	Farklı deney grupları (kontrol, parazitenmiş ve zehir enjekte edilmiş) zaman ve etkileşimlerinin <i>G. mellonella</i> pupu farklı hemosit sayılarına etkilerini gösteren ANOVA tablosu	54
Tablo 3.9	Zehir enjeksiyonunun <i>G. mellonella</i> larvasında granülosit sayılarına (Granülosit/1000) etkileri	55
Tablo 3.10	Zehir enjeksiyonunun <i>G. mellonella</i> larvasında plazmatosit sayılarına (Plazmatosit/1000) etkileri	57
Tablo 3.11	Zehir enjeksiyonunun <i>G. mellonella</i> larvasında diğer hemosit tipi sayılarına (DH/1000) etkileri	58
Tablo 3.12	Farklı deney grupları (kontrol ve zehir enjekte edilmiş) zaman ve etkileşimlerinin <i>G. mellonella</i> larvası farklı hemosit sayılarına etkilerini gösteren ANOVA tablosu	60
Tablo 3.13	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> pup evresinde erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücrelerin (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	64
Tablo 3.14	Farklı deney grupları, hücre durumları (erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı) ve zaman ve etkileşimlerinin <i>G. mellonella</i> pupu apoptotik ve nekrotik indekse etkilerini gösteren ANOVA tablosu	67
Tablo 3.15	<i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücrelerin (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	72
Tablo 3.16	Farklı deney grupları, hücre durumları (erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı) ve zaman ve etkileşimlerinin <i>G. mellonella</i> larvası apoptotik ve nekrotik indekse etkilerini gösteren ANOVA tablosu	75

Tablo 3.17	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> pup evresinde mitoz evresindeki hücrelerin (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	76
Tablo 3.18	Farklı deney grupları, zaman ve etkileşimlerinin <i>G. mellonella</i> pupunda mitotik indekse etkilerini gösteren ANOVA tablosu	79
Tablo 3.19	Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde mitoz evresindeki hücrelerin (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	81
Tablo 3.20	Farklı deney grupları, zaman ve etkileşimlerinin <i>G. mellonella</i> larvasında mitotik indekse etkilerini gösteren ANOVA tablosu	82
Tablo 3.21	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> pup evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	86
Tablo 3.22	<i>P. turionellae</i> zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	89
Tablo 3.23	Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> pup evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	91
Tablo 3.24	Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak <i>G. mellonella</i> larva evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri	93

## ÖNSÖZ

Lisansüstü çalışmalarım süresince değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgisini, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen ve yanımda olan, çok değerli Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez izleme komisyonunda bulunan ve sunumlarıma özveriyle katılarak değerli görüşlerini bizimle paylaşan ve tezime yön veren sayın juri üyeleri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Gürsel ERGEN ve Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Hatice TORCU KOÇ'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın her aşamasında değerli öneri ve bilgilerinden yararlandığım, destekleriyle moral ve güç veren çok değerli hocalarım Doç. Dr. Ekrem ERGİN ve Yrd. Doç. Dr. Olga SAK'a sonsuz teşekkür ederim. Floresans mikroskopunun kullanımı da dâhil olmak üzere laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Kocaeli Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm başkanı Prof. Dr. Fazıl ÖZEN'e ve diğer öğretim elemanlarına teşekkür etmeyi borç bilirim. Eğitimim boyunca pek çok acı-tatlı olayı birlikte yaşadığımız ve tez süresince manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarıma ve Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim elemanlarına teşekkür gönül borcumdur.

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, sevgi ve güvenlerini benden hiç esirgemeyen, eğitimimi sürdürebilmem için bana her türlü imkanı tanıyan canım annem, babam ve kardeşime yürekten minnettar olduğumu belirtmek isterim. Son olarak tüm sıkıntılara ortak olan, sevgisini ve manevi desteğini her zaman hissettiren, gösterdiği sabır ve tezimin her aşamasındaki yardımlarından dolayı sevgili eşim Gökçen ER'e ve tezimin yazım aşamasında ailemize katılıp bir gülümsemesiyle bana tüm yorgunluğumu unuttururan biricik kızım Selin'e sonsuz teşekkürler.

**Balıkesir, 2011**

**AYLİN ER**

## 1. GİRİŞ

Doğal kaynakların korunması, bozulan ekolojik dengenin yeniden tesisi, sürdürülebilir tarım ile biyolojik çeşitliliğin devamı, toprağın yaşatılması ve kimyasal kirliliğin sonlandırılması çevre direncinin artırılması çalışmalarında temel amaç olmuştur. Tarımsal sistemlerde kimyasal kirliliğin temel nedenlerinden olan bilinçsiz ve kontrolsüz pestisit kullanımının ortaya çıkardığı sonuçlar, hem ekolojik hem de ekonomik açıdan büyük sorunlara neden olmaktadır [1, 2]. Örneğin kullanılan kimyasal maddeler hava, su ve toprakta birikmekte ve besin zinciri yoluyla biyolojik sistemlere geçmektedir. Ayrıca, canlıların değişik dokularında birikerek kanserojen, teratojen ve mutajen etki gösterdikleri bilinmektedir. Denetimsiz ve düzensiz kullanım zararlıda direnç oluşturmakta, bu durum dozun her geçen gün daha da artırılmasını ya da kimyasalın değiştirilmesini gerektirmekte, bu da gittikçe artan bir ekonomik yük getirmektedir [3, 4]. Kimyasal mücadelenin ortaya çıkardığı bu sorunlar tarım, orman, hayvancılık ürünlerine, bitki örtüsüne ve ekolojik dengeye zarar veren böceklerle biyolojik olarak mücadelenin önemini arttırmıştır. Biyolojik kontrolde kullanılan ajanlar içinde en uygunu, en az risk taşıyan ve en çok spesifik etki yapanı ekolojik can simitleri olarak da nitelendirilebilen parazitoitlerdir [2, 5].

Parazitoitler biyolojik özelliklerine göre değişik şekillerde sınıflandırılmaktadır. Larvalarının beslenme davranışına göre, parazitoitler endo ve ekto parazitoitler olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır [6, 7]. Yumurtalarını konağın içine bırakan ve larvaları konağı içten yiyerek gelişen parazitoitler endoparazitoitler olarak sınıflandırılırken [8, 9, 10], yumurtalarını konak yüzeyine bırakan ve larvaları, vücutları dışarıda, ağız parçaları ise konak vücudu içine gömülü olacak şekilde beslenen ve gelişenler ektoparazitoitler olarak sınıflandırılırlar [11, 12]. Ovipozisyondan sonra konağın gelişimine izin veren parazitoitler koinobiont, ovipozisyondan önce konağı öldüren veya felç edenler ise idiobiont olarak tanımlanmıştır [6, 7]. Ayrıca, bir konaktan elde edilen ergin birey sayısına göre de

parazitoitler, gregar ve soliter parazitoitler olarak iki gruba ayrılabilir [6]. Soliter parazitoitlerde, bir konağa, dişi parazitoit tarafından birden fazla yumurta bırakılsa da, bunlardan sadece bir tanesi ergin evreye ulaşabilir [13, 14]. Ancak, gregar olanlarda çok sayıda larva ergin evreye ulaşabilmektedir [6]. Parazitoitler yumurta bıraktıkları konak evresine göre, yumurta, larva, pup ve ergin parazitoitleri olarak da sınıflandırılmaktadır [6]. Parazitoitler Hymenoptera, Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera ve Heteroptera gibi değişik böcek takımlarına ait türlerin, yumurta [7, 15, 16], larva [7, 17, 18], prepup [7, 11], pup [7] ve ergin [19] evrelerini konak olarak kullanabildikleri gibi, değişik örümcek ve akarların farklı evrelerini de konak olarak kullanabilirler [20]. Böcekler dünyasında, parazitoit olarak tanımlanmış türler, Hymenoptera, Diptera, Hemiptera ve Coleoptera takımlarına mensup türler olarak sınıflandırılmaktadır [6]. Ancak, parazitoit türlerin çok büyük bir çoğunluğu Hymenoptera ve Diptera takımlarının üyeleridir [6].

Zararlı böceklerle biyolojik olarak mücadeleye artan ilgi parazitoit türlerin temel biyolojik özelliklerinin ve konakları ile etkileşimlerinin çok iyi bilinmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Halen, zararlı böceklerin kontrolünde kullanılan insektisitlerin çok azını çevreye ve sağlığa çok daha az zararlı etkisi olan doğal toksinler ve büyümeyi engelleyici maddeler oluşturmaktadır. Bu maddelerden parazitoitlerden elde edilenlerin hedef zararlı türler üzerindeki spesifik metabolik ve fizyolojik etkilerini belirlemek, fizyolojik açıdan olduğu kadar ekonomik, ekolojik, çevre ve insan sağlığı açısından da oldukça önemlidir. Bu bakımdan, biyolojik mücadelede doğal bir kaynak oluşturan parazitoit türlerin parazitlenme esnasında konaklarına aktardıkları salgıların içeriğinin ve bu salgıların konak bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, günümüzde birçok çalışmanın temelini oluşturmaktadır. Parazitoitler güçlü biyolojik kontrol ajanları olmalarının yanı sıra, konakları üzerindeki karmaşık fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalar tam olarak açığa çıkarıldığında yeni biyopestisitlerin geliştirilmesi için model oluşturabilirler.

Parazitoitlerin önemli bir kısmını bulandıran Hymenoptera takımı biyolojik kontrolde önemli bir yer tutmaktadır [1, 9, 11, 15]. Yaklaşık 225.000 türe sahip olduğu düşünülen parazitoit arılar [6] nesillerinin devamı için başarılı bir şekilde yumurta bırakabilecekleri bir veya birkaç doğal konak türüne sahiptirler [21].



Parazitoit türler gelişimleri için uygun ortam sağlamak amacıyla genellikle konakları olan böceklerin zararına olacak şekilde, konak bağışıklık, endokrinoloji, gelişim ve metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesini içeren çeşitli mekanizmalara sahiptirler [22]. Parazitoit türler tarafından konak metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesi, konak uygunluğundaki artışla sonuçlanan karmaşık bir süreçtir. Konak türe yumurta bırakan dışının ovipozisyon öncesi veya esnasında konağa enjekte ettiği salgıların konak fizyolojisini düzenleyen maddeler ihtiva ettiği gösterilmiştir [23]. Kaçınılmaz olarak konaklarının ölümüne neden olan Hymenoptera parazitoit türler, yumurta ve larvalarının konak içinde veya üstünde yaşamalarını ve gelişmelerini sağlamak için karmaşık metabolik ve fizyolojik etkileşimlerden faydalanırlar [6]. Konak hareketlerinin geçici veya sürekli olarak kısıtlanması veya tamamen durdurulması, konak gelişiminin yavaşlatılması veya durdurulması gibi etkiler bu etkileşimlerin temelini oluşturmaktadır. Konak türün fizyolojik özellikleri, yumurta bırakma öncesinde veya esnasında dişi ergin parazitoit tarafından ovipozitor aracılığı ile konağa enjekte edilen kaliks sıvısı, polidnavirüsleri (PDVler), teratositler ve zehir salgısı ile değişime uğramaktadır [24 - 45]. Parazitoit salgısı içerisinde bulunması muhtemel bu bileşenlerin nispi önem ve miktarları ise parazitoit türlere göre farklılık gösterebilmektedir [46]. Konak- endoparazitoit ilişkisindeki süreç şu şekildedir:

- Ergin dişi parazitoit tarafından konağa yumurta bırakılması,
- Parazitlemeye bağlı olarak konakta oluşan fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler,
- Konağın ölümüyle sonuçlanan, parazitoit neslinin konak vücut boşluğundan çıkması [47].

Birçok endoparazitoit tür konaklarının büyüme ve gelişimini düzenler ancak bu etkilerin büyüklüğü ve süresi konak- parazitoit etkileşimi içinde türden türe değişiklik gösterebilir [48].

Konak böceğin fizikokimyasal bariyerlerini aşp vücut boşluğu içerisine giren ve gelişimini burada sürdüren endoparazitoit yumurta ve larvaları, konağın kendinden olmayanı algılaması sonucu konak doğal bağışıklık savunması riski altındadır [37, 38, 49, 50]. Konak – parazitoit ilişkisi içinde konak doğal bağışıklık

sistemi, parazitoit aktivitesinden dolayı konağın ölmesi veya konak bağışıklık sistemi aktivitesi sonucu parazitoitin ölmesi ile sonuçlanan oldukça güçlü bir seçim baskısı oluşturur [21, 51]. Bu organizmaların yaşamını sürdürebilmesi için parazitlemenin ilk evresi oldukça önemlidir. Örneğin, konak böceğin parazitoit larvasının beslenmesine uygun hale getirilmesi amacıyla ergin dişi parazitoit konak içine konağın savunma tepkilerini baskılayacak çeşitli faktörler enjekte eder. Alternatif olarak, dişi parazitoit ovipozisyonu tamamlasa bile parazitoit yumurta ve larvaları konak bağışıklık tepkileriyle yok edilebilir [51].

### **1.1 Böceklerde Bağışıklık Sistemi**

Çok hücreli hayvanların enfeksiyon yapıcı organizmalara karşı savunma mekanizmaları doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklık olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır [21, 52, 53]. Doğal bağışıklıkta doğuştan kazanılan, canlıyı enfeksiyon yapıcı organizmalara karşı koruyan, organizmanın yapısal ve genetik özelliklerine bağlı doğal bir direnç söz konusudur [21, 52, 53]. Edinsel bağışıklıkta ise somatik genlerin yeniden ifadesiyle oluşan ve spesifik antijenlerin tanınmasını sağlayan reseptörler oluşturularak organizmanın immünolojik bir hafıza geliştirmesi söz konusudur [52, 54]. Doğal bağışıklık sisteminde yabancı organizmaların geniş bir sınıfı algılanabilirken, edinsel bağışıklık sisteminde spesifik organizmalar algılanabilir [21]. Omurgalı hayvanlar hem doğal hem de edinsel bağışıklık sistemine sahipken böcekler ve diğer omurgasızlar sadece doğal bağışıklık sistemine sahiptirler [55]. Böceklerde yabancı organizmalara karşı ilk bariyer integument sistem ve bağırsaklar tarafından sağlanır [52]. Tüm böcekler bir kutiküla tabakasıyla kaplıdır ve kutiküla aynı zamanda sindirim kanalının üst ve alt kısımları ve trakeal sistemin ektodermal kılıflarını kaplar [56]. Endokutiküla, ekzokutiküla ve epikutiküla katmanlarından oluşan bu koruyucu kalkan 200 µm kalınlığa ulaşabilir. Endokutiküla ve ekzokutikülanın karakteristik bileşeni bir polisakkarit olan kitindir ve her kitin molekülü komşu kitin molekülüne bir protein matriks içerisinde bulunan mikrofibrilleri oluşturmak için hidrojen bağlarıyla bağlanır. Ekzokutikülada protein molekülleri arasındaki çapraz bağlar yüksek oranda reaktif olan kateşolaminler tarafından oluşturulur ve bu durum integumentin bu parçasının sklerotizasyon

denilen süreçle kalınlaşmasını sağlar. Ekzokutikülayı kaplayan kısım olan epikutiküla hücre dışı fenoloksidaz içerir ancak kitin içermez. Epikutiküla fenoloksidaz enziminin varlığı bu tabakanın hasar görmesini takiben onarımında sklerotizasyonu sağlar. Epikutikulanın en üst kısmını ise mum tabakası kaplamaktadır [57]. Bu tabakalar fiziksel engel gibi davranarak patojen ve parazitler için ilk bariyeri oluştururlar. Bunun yanında mum tabakasını oluşturan lipitler oldukça hidrofobiktir ve çoğu hidrofilik olan hastalık etkenlerini uzak tutar. Ayrıca kutiküla içerisinde bulunan fenoloksidaz aktivitesi sonucu oluşan ürünler patojenler için toksik olabilmektedirler ve integümentin zarar görmesi durumunda alt kısımda uzanan epidermal hücreler antibiyotik özellikte peptitler sentezlerler ve hemositlerin cevap vereceği bir sinyal mekanizması oluştururlar [57, 58, 59].

Böceğin fizikokimyasal bariyerlerini aşıp vücut boşluğu içerisine giren patojen ve parazitler, böceğin kendinden olmayanı algılaması sonucu bağışıklık tepkileriyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Böceklerde bağışıklık sistemi humoral bağışıklık ve hücrel bağışıklık olmak üzere iki kısımda ele alınmaktadır.

### **1.1.1 Humoral Bağışıklık**

Bakteriler, mantarlar ve protozoonlar gibi patojenik mikroorganizmalar böceklerdeki fiziksel bariyerleri aştığında sitotoksik peptit ve proteinlerle karşılaşılır [59, 60, 61]. Humoral savunma sürecinde melanizasyon, hemolenfin pıhtılaşması ve antimikrobiyal peptitlerin sentezi olmak üzere üç tip reaksiyon gerçekleşmektedir [62]. Siyah pigment melanin oluşumu serin proteazlarla aktif formuna dönüşen fenoloksidaz enzimi ile gerçekleşir [63]. İnaktif proenzim profenoloksidaz hemositlerde sentezlenir ve hücrelerin patlamasıyla ortama salındıktan sonra kutikülaya gönderilir veya yaralanma bölgesinin etrafında ya da enkapsüle olmuş parazitlerin etrafında birikir [62]. Aktive olmuş fenoloksidazlar hemolenfte bulunan fenolik substratlardan kinonları oluştururlar ve bu bileşikler gerekli yüzeylerde oligomerleşip melanin olarak birikirler [62]. Melanin oluşumunu sağlamanın yanı sıra ara kinon ürünleri hemolenfin pıhtılaşması sonucu hareketsizleşen mikroorganizmaları öldürebilecek güçte sitotoksik maddelerdir.

Böcek bağışıklık sistemi ile ilgili çalışan birçok araştırmacı fenoloksidazın pıhtılaşma ve yara iyileştirme sürecinde mükemmel bir enzim olduğunu savunmaktadırlar [64, 65].

Omurgalı ve omurgasız hayvanlar arasındaki en önemli farklardan biri omurgalılarda vücut sıvıları çoğunlukla kan ve lenfatik damarlar içerisinde sınırlandırılırken, omurgasızlarda açık dolaşım mevcuttur. Bu nedenle herhangi bir yaralanma sonucu kan kaybını önlemek ve mikropların vücut boşluğuna girip yayılmasını engellemek için omurgasızlarda etkili mekanizmalar mevcuttur. Hemolenfin pıhtılaşması bu etkili mekanizmalardan biridir [66]. Böceklerde hemolenfin pıhtılaşmasında proteinlerin polimerizasyonu, hemositlerden salgılanan  $Ca^{+2}$  bağımlı transglutaminaz tarafından katalizlenir ve hamam böceği *Leucophaea maderae* L. (Dictyoptera: Oxyhaloinae) [67] ve çekirge *Locusta migratoria* (L.) (Orthoptera: Acrididae) [68]'da iyi çalışılmıştır. Lepidopterlerde pıhtılaşma sistemi dört basamak içermektedir [69]. İlk olarak hemositlerin degranülasyonu hücre dışı agregatların oluşmasını sağlar ve bu agregatlar yara bölgesini kaplayarak primer veya yumuşak pıhtı denen yapıyı oluşturur. İkinci olarak profenoloksidazın aktivasyon basamakları ve transglutaminaz ardışık olarak pıhtıda çapraz bağlar oluşmasını sağlar ve pıhtı kalınlaşır. Üçüncü olarak plazmatositler bu bölgeye çekilerek pıhtının etrafını sararlar ve kabuklaşarak vücut boşluğundan ayrılırlar. Son olarak yara bölgesinde epidermisin rejenerasyonu gerçekleşerek kabuğun yerini alır [69]. Tüm bu reaksiyonların nasıl başladığı henüz tam olarak bilinmese de, plazmatositlerin o bölgeye gitmesini uyaran ve yine plazmatositlerden salgılanan plazmatosit yayılma faktörü varlığı gösterilmiştir [52]. Araştırmacılar pıhtılaşma, nodül ve kapsül oluşumunda ilk üç basamağın birbirine benzediğini ancak son basamakta her bir bağışıklık tepkisinin ayrı görüntüde olduğunu bildirmişlerdir [69].

Böceklerde enfeksiyona karşı geliştirilen humoral reaksiyonların üçüncü tipi antimikrobiyal peptitlerin sentezidir [21, 52, 62, 70]. Bu sitotoksik moleküller temel olarak yağ dokuda sentezlenmektedir [62] ancak yapılan çalışmalarda epidermis hücrelerinde [71, 72], orta bağırsakta [73, 74], tükürük bezlerinde [75], üreme sisteminde [76, 77] ve hemositlerde'de [59] sentezlendikleri gösterilmiştir. Son yıllarda böceklerde antimikrobiyal peptitlerin sentezi ile ilgili çalışmalar arttıkça

moleküler ağırlıkları 5 kDa'dan küçük 170'den fazla sitotoksik peptit ve protein bulunmuştur [56]. Bu peptitler yapısal olarak farklılık gösterebilir de tümü amfipatik özelliktedir ve membranlar üzerinde etkili olarak hedef hücrenin lizis ile ölmesine neden olurlar [78, 79]. Böcekler enfeksiyona karşı bu antibakteriyel peptitlerin bir kombinasyonunu sentezleyerek bakteri kılıfının farklı bileşenleri üzerinde etkili olurlar [80]. Antimikrobiyal proteinler yapısal ve dizilim özelliklerinin benzerliklerine göre ve bakteri hücre duvarındaki hedef bölgelerine göre sınıflandırılmaktadırlar [62].

Böceklerin fizyolojik olarak oluşturduğu en iyi bilinen antibakteriyel proteinler attasinler, lizozimler, sekropinler, defensinler ve dipterisinlerdir [81]. Bu antibakteriyel peptitler enfeksiyonu takiben 2 saat sonra ortaya çıkarlar ve 24 saat içerisinde en üst seviyeye ulaşırlar. Bazı böceklerde aktiviteleri dört gün gibi kısa süreli olmakla beraber diğerlerinde aktiviteleri aylarca sürebilir [70]. Attasin proteinlerinin varlığı kelebeklerde [82, 83] ve *Drosophila*'da [84] tespit edilmiştir. Bu proteinler sadece gram-negatif organizmalara etkilidirler ve dış membran proteinlerinin sentezini inhibe ederek hücre bölünmesini etkilerler [85]. Lizozimler ise bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasındaki  $\beta$ - 1,4 glikozit bağlarını hidroliz ederek etkili olurlar. Böcek lizozimleri 14 kDa moleküler ağırlığa sahip olup omurgalı lizozimlerine benzerlik gösterirler [86]. *Drosophila*'da lizozimler en az yedi gen tarafından kodlanırlar ve ifadeleri gelişimin farklı evrelerinde ve sindirim sisteminin farklı bölgelerinde gerçekleşir [86]. Sekropinler voltaj bağımlı iyon kanallarını oluşturan lipit membranlar ile etkileşerek hem Gram-pozitif hem de Gram- negatif bakteriler üzerine etkilidirler [87]. 4 kDa moleküler ağırlığa sahip olan sekropinler sisteinden yoksundurlar ve birbirine bağlı iki  $\alpha$ - heliks yapısına sahiptirler [88]. Defensinler, attasin benzeri antibakteriyel proteinlerin aksine Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkilidirler ve sitoplazmik zarlar üzerinde etkili olup membran kanalları oluşumuyla hücrelerin lizisine neden olurlar [77]. Böcek defensinleri 4 kDa moleküler ağırlığa sahip katyonik peptitlerdir ve üç disülfid bağıyla birbirine bağlı altı sistein rezidüsü içerirler. Çeşitli böcek türlerinde yaklaşık 30 tip defensin karakterize edilmiştir [89 - 94]. Yapılan araştırmalarda farklı memeli ve bitki türlerinde de defensinler tanımlanmış ancak bunların böcek defensinleriyle homolog olmadıkları tespit edilmiştir [95]. Diğer bir antimikrobiyal peptit tipi olan

dipterisiner sadece Diptera türlerinde tanımlanmıştır [96 - 98]. Molekül ağırlıkları 9 kDa olan bu peptitler gram- negatif bakteriler üzerine etkilidirler ve attasinlere benzer bir etki mekanizmalarının olduğu düşünülmektedir [62].

### 1.1.2. Hücresel Bağışıklık

Böceklerde ve açık dolaşım sistemine sahip diğer hayvanlarda, omurgalılarda olduğu gibi kan ve lenfatik sıvıların ayrımı olmadığı için vücut sıvıları hemolenf olarak adlandırılmaktadır. Benzer şekilde hemolenf dolaşımında yer alan hücrelere de hemositler denmektedir [99]. Böceklerde mikro veya makro organizmalarla enfeksiyon sonucu ortaya çıkan humoral bağışıklık tepkilerinin yanında hemositlerin morfolojik ve yapısal değişiklikleri sonucu hemosit aracılı gerçekleştirilen hücresel bağışıklık tepkileri de ortaya çıkmaktadır [52, 53, 57, 59, 99 - 101]. Bunun yanında humoral ve hücresel bağışıklıkta rol alan hemositler ve humoral biomoleküller birbirinden bağımsız çalışmamaktadır. Birçok humoral faktör hemosit fonksiyonlarını etkileyebildiği gibi, hemositler de birçok humoral molekülün sentezinde önemli bir kaynak oluştururlar [52, 56, 100]. Hücresel bağışıklık tepkileri ise fagositoz, enkapsülasyon ve nodül oluşumu gibi savunma mekanizmalarını gerçekleştiren hemositler tarafından oluşturulur [21, 35, 36, 52, 62, 100, 101]. Böcek hemositleri tip, morfoloji ve sayı olarak türden türe değişiklik gösterir ve tanımlanmalarını kolaylaştırmak amacıyla sınıflandırma şemaları literatürde mevcuttur [52, 99 - 101]. Morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel karakterlerine göre, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Collembola gibi çeşitli takımlarda tanımlanan en genel hemosit tipleri prohemositler, granülositler, plazmatositler, sferülositler ve önositoidlerdir [21, 52, 62, 100 - 104].

Prohemositler yuvarlak veya oval şekilli olabilen oldukça küçük (4-10  $\mu\text{m}$  genişliğinde ve 4-14  $\mu\text{m}$  uzunluğunda) hücrelerdir (57, 101, 103, 105, 106). Prohemositler sitoplazmayı neredeyse tamamen dolduran oldukça büyük bir çekirdeğe sahip olup endoplazmik retikulum, golgi aparatı ve mitokondri gibi diğer organeller genellikle az sayıdadır [56, 99]. Sentioller ve mikrotübüller içerdikleri

için bu hemositlerin aktif mitotik hücreler olduğu belirtilmekte ve prohemositlerin diğer hemosit tiplerinin öncüleri olduğu savunulmaktadır [56, 99 - 101]. Prohemositlerin dolaşımdaki oranları böceğin gelişim ve fizyolojik durumuna göre değişiklik gösterebilmektedir ancak bu oran genellikle % 5'i geçmez [99, 101].

Plazmatositler boyları 3 µm'den 40 µm'ye kadar ulaşabilen ve hemolenfte dolaşım esnasında yuvarlak veya oval şekilli bulunan hemositlerdir [57, 99, 101, 103]. Farklı böcek türlerinde dolaşımdaki toplam hemositlerin % 30-60'ını oluştururlar [56]. Transmisyon elektron mikroskopunda birkaç yalancı ayak, pinositik veziküller, vakuoller ve poliribozomlar gözlenebilir ve golgi aparatı az gelişmiştir [100]. Birçok lepidopter türünde plazmatositler granüllerden yoksundur [100, 107], ancak *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'da bu hücreler granül içerebilir [108]. Yayma preparatlarda inkübasyonu takiben birkaç dakika sonra cam üzerine yapışıp yalancı ayaklar ile yayılabilme ve karakteristik ince ve uzun fibroblast benzeri özellikleriyle diğer hemosit tiplerinden kolayca ayırt edilebilirler [100]. Plazmatositler, fagosite edilemeyecek kadar büyük olan yabancı cisimlerin, bakteri topluluklarının veya nekrotik melanize olmuş materyallerin etrafında kapsüller ve nodüller oluşturabilirler [52, 100]. Plazmatositlerin fagositozdaki rolü henüz tam netliğe kavuşmamıştır. Bazı araştırmacılar bu hücrelerin fagositozda rol oynadıklarını savunurken [109, 110], bazıları bunların fagositik hücreler olmadıklarını savunmaktadırlar [111].

Granülositler çapları 4-45 µm arasında değişebilen küresel veya oval hücrelerdir [56]. Granülositlerin en karakteristik özellikleri sitoplazmalarında membrana bağlı çok sayıda granül içermeleridir [52, 99, 100]. Transmisyon elektron mikroskopunda ise gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumları, birçok pinositik vezikülleri, ince ve uzun yalancı ayakları tespit edilmiştir [100]. Çok sayıda lizozom ve serbest ribozom içerirken az sayıda mitokondri içerirler [57, 101]. Çekirdek yuvarlak veya uzamış ve merkezi yerleşimlidir [56]. Farklı böcek türlerinde granülositler toplam hemosit sayısının % 30-60'ını ihtiva ederler ve plazmatositlerle birlikte birçok böcek türünde en fazla bulunan hemosit tipidir [57, 99]. Plazmatositler gibi granülositler de yabancı yüzeylere yapışma özelliğine sahiptirler ve yara iyileştirme ve bağışıklık tepkilerinde çok önemli rolleri oldukları

bilinmektedir [57, 99, 101]. Granüler hemositlerin en önemli fonksiyonunun fagositoz olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir [107, 109, 111]. Granüler hemositlerin aynı zamanda kapsül / nodül oluşumu sırasında yabancı cisimlerle ilk temas kuran ve granüler içeriğini dışarı veren hücreler olduğu tespit edilmiştir. Birçok araştırmacı, granüler hemosit içeriğinin bu şekilde ekzositozunun plazmatositleri o bölgeye çekmekte iş gördüğünü [100] veya en azından kapsül veya nodül oluşumu sırasında plazmatositlere yardımcı olacağını [112] düşünmektedir.

Önositoidler çapları 54 µm'yi bulan yuvarlak veya oval şekilli oldukça büyük hücrelerdir [56, 99]. Çekirdekleri merkezi değildir ve transmisyon elektron mikroskobu görüntülerine göre sitoplazmalarında birçok serbest ribozom içerirler ancak diğer tipik sitoplazmik organelleri az gelişmiştir [100]. Bazı önositoidler çubuk, iğne veya kristal şeklinde sitoplazmik inklüzyonlar içerebilirler örneğin *Drosophila*'da inklüzyonların şekli nedeniyle önositoidler kristal hücreler olarak adlandırılırlar [101, 113]. Önositoidler toplam hemosit popülasyonunun % 1-2'sini oluştururlar [99] ve Lepidopterlerde diğer hemosit tiplerine kıyasla en büyük hemositler oldukları belirtilmiştir [57, 101]. Birçok Lepidopter türünde hazırlanan preparatlarda önositoidler oldukça nazik ve in vitroda hemen lizise uğrayan hücreler olarak göze çarpılmaktadırlar [114] ancak *G. mellonella* önositoidlerinin daha dayanıklı hücreler oldukları bildirilmiştir [99]. Lepidopterlerde bağışıklık sisteminde ve yara iyileştirmede oldukça önemli rol oynayan hemolenfin koyulaşmasından (melanizasyon) sorumlu olan fenoloksidaz enzimi bu hemositlerde mevcuttur [107, 115 - 117]. Ashida ve ark. (1988) fenoloksidazın *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae)'de önositoidler içinde sentezlendiğini ve bu hücrelerin parçalanması sırasında plazmaya salındığını tespit etmişlerdir [117].

Sferülositler çapları 5-25 µm arasında değişebilen yuvarlak veya oval hücrelerdir [57, 101]. Dolaşımında görülme sıklıkları tüm hemosit popülasyonu içinde % 5'den azdır [99]. Karakteristik özellikleri sitoplâzmalarını tamamen doldurup hücre membranının gerilmesine neden olan 1,5-3 µm çapında sferüller içermeleridir [99]. Sferüllerin histokimyasal analizleri mukopolisakkarit ve glikomukoprotein içerikte olduklarını göstermektedir [101]. Sitoplâzma aynı zamanda ribozomlar, golgi, lizozomlar, mitokondri ve endoplazmik retikulum içermektedir [56]. Bazı



araştırcılar sferüositlerin ipek üretimi, melanizasyon, fagositoz ve pıhtılaşmanın düzenlenmesinde görev aldıklarını savunsalar da sferüositlerin bağışıklık sistemideki fonksiyonları henüz netlik kazanmamıştır [57, 101, 105].

*G. mellonella* hemosit tiplerinin belirlendiği bir çalışmada Ashhurst ve Richards (1964) [118] temel hemosit tiplerinin prohemositler, plazmatositler, adipohemositler, sferül hücreler ve önositoidler olduğunu belirtmişlerdir. Jones (1967) [119] ise prohemositler ve plazmatositlerin ayrımı çok zor olduğu için her iki hücre grubunu tek bir kategoriye alarak plazmatositoid terimini kullanmıştır. Neuwirth (1973) [120] *G. mellonella*'da daha önceki çalışmalarda yağ damlaları içerdiği için adipohemosit olarak adlandırılan hemosit tiplerinin aslında granüler hemositler olduğunu ve pup evresine yaklařtıķça bu yağ damlalarının genişleyerek sayılarının arttığını belirtmiştir.

Hemositler ilk olarak embriyogenez esnasında baş veya dorsal mezodermden gelişirler [99, 113]. Mezodermal olarak türemiş hematopoitik organlarda var olan kök hücrelerin bölünmesi yoluyla ve/veya dolaşımdaki hemositlerin bölünmeye devam etmesiyle böceklerde hemositler üreilmeye devam eder [99, 121]. Birçok böcek türünde hematopoitik organlar farklı vücut kısımlarında tespit edilmiştir [99]. Lepidopter larvalarında genellikle toraksta imajinal kanat diski ile beraber, bazı dipterlerde ise abdomenin posterior segmentinde buldukları bildirilmiştir [122, 123]. Farklı hemosit tiplerinin kökeni ve farklılaşması hakkında birçok farklı senaryo literatürde mevcuttur. *B. mori* ile yapılan bir çalışmada hematopoitik organda bulunan ve dolaşıma bırakılan prohemositlerin öncelikle plazmatositlere farklılaştığı ve dolaşımdaki granüosit, sferüosit ve önositoidlerin plazmatositlerden köken aldığı belirtilmiştir [53, 124]. Bununla beraber *B. mori*'de kısa vadeli hemosit kültürü çalışmalarında prohemositlerin plazmatositler, granüositler ve sferüositlere farklılaşabileceği bildirilmiştir [125]. *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) ve *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) hematopoitik organlarında prohemositler ve plazmatositlerin varlığı belirlenmiş ancak diğer hemosit tipleri sadece dolaşımda tespit edilmiştir [126]. Aynı çalışmada hematopoitik organlardaki prohemosit/plazmatositler ve dolaşımdaki önositoidler hariç tüm hemosit tiplerinin aktif olarak bölünebildiği

bildirilmiştir [126]. Günümüzde hemositlerin oluşumu ve farklılaşması hakkında farklı teoriler olsa da genel kanı (1) prohemositlerin hematopoietik organlarda ilk olarak plazmatositlere farklılaştığı, diğer hemosit tiplerinin ise dolaşıma salındıktan sonra farklılaştığı ve (2) dolaşımdaki hemosit populasyonlarının hücre farklılaşmalarından sonra devam eden hücre bölünmeleri ile sağlandığı şeklindedir [52]. Ancak literatürde *G. mellonella*'da hematopoietik organın varlığına dair bir veriye rastlanmamıştır. *G. mellonella*'da mitotik indeksin araştırıldığı bir çalışmada dolaşımdaki hemositlerin % 1 oranında mitotik fazda olduğu ve bu oranın larval evre boyunca hücre sayılarını devam ettirmede yeterli olduğu belirlenmiş ve bir hematopoietik organa ihtiyaç olmadığı belirtilmiştir [127].

### **1.1.3. Hemosit Aracılı Bağışıklık Tepkileri**

Böceklerde hücrel savunma reaksiyonlarında hemositler temel olarak fagositoz, nodül oluşumu ve enkapsülasyonda rol almaktadırlar [52, 56, 99 - 101]. Bu hücrel savunma tepkilerinde rol alan hemositler plazmatositler ve granüositlerdir, önositoidler ise daha önce bahsedildiği gibi melanizasyonda görev alırlar [56].

#### **1.1.3.1. Fagositoz**

Fagositoz böceklerde bakteriler, virüsler, mantar ve protozoalar gibi küçük organizmalara karşı hemositlerin gösterdiği temel bir bağışıklık tepkisidir [52, 56, 100, 101]. Plazmatositler ve granüositler farklı böcek türlerinde fagositozdan sorumlu olan temel hücrelerdir [56, 99, 101]. Fagositozun başlaması hemositler tarafından yabancı organizmanın kendinden olmayan olarak algılanması ile başlar [59, 99, 101]. Bu tanıma hemositler tarafından yabancı organizma üzerindeki peptidoglikan, lipopolisakkarit ve  $\beta$ -1,3- glukozlar gibi yüzey moleküllerinin direkt olarak belirlenmesi ile olabildiği gibi [52], örnek tanıma proteinleri veya daha genel olarak opsoninler adı verilen ve fagosite edilecek partikülü hücrel saldırı için işaretleyen proteinler yardımı ile de gerçekleşmektedir [52]. Bu tip örnek tanıma

proteinleri hemolin, peptidoglikan tanıma proteinleri,  $\beta$ -1,3- glukoz tanıtma proteinleri ve C-tipi lektinleri ihtiva eder [115, 128]. Direkt veya opsonin bağımlı her iki tanıma sisteminde de hemositler yabancı partiküle immün saldırıyı başlatabilmek için örnek tanıma reseptörlerine sahiptirler [52]. Yabancı organizmanın tanınmasını takiben fagositoz basamakları organizmaya yapışma, organizmanın içeri alınması için sinyal iletiminin başlaması, yabancı ayakların oluşumu, yabancı maddenin hücre iskeletinin parçası olan aktin yardımıyla içeri alınması ve fagozom denilen veziküller içerisinde ayrıştırılması ile tamamlanır [52, 56, 59]. Bu basamakları takiben sindirim enzimleri içeren lizozomlar fagozomlarla birleşerek içeri alınan yabancı partikülün parçalanmasını sağlar [129].

### 1.1.3.2. Nodül Oluşumu

Nodüller fazla sayıda yabancı partikülün etrafında bulunan, genellikle melanize olmuş nekrotik bir merkeze sahip olan hücre dışı pıhtı ve hemosit agregatlarıdır [99, 101]. Böceklerde nodüller yüksek konsantrasyonlarda cansız maddelere karşı olabildiği gibi, bakteri, fungal sporlar, maya hücreleri ve protozoonlara karşı da oluşabilmektedir [57, 59, 99, 101]. *G. mellonella* ve *Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) ile yapılan çalışmalarda yüksek dozlarda bakteri enjeksiyonunu takiben nodül oluşumunun ilk aşamasının hemosit ve mikroorganizma kümeleri oluşumu olduğu tespit edilmiştir [130]. Bakteriler ile teması takiben granülositler içerisinde bulunan granüller şişmeye başlar, hücre dışına göç ederler ve bakterilerin tutulmasını sağlayan yapışkan bir maddeyi hemolenfe bırakırlar. Bu durum bakteri ve hemositlerin hücre dışı matrikste gömülmesini sağlar. Nodül genişledikçe granülositler degranülasyona devam ederler ve nodül sıkılaştıkça yakalanmış bakterilerin etrafında melanin birikimi olur. Nodül oluşumunun başlamasını takiben 2-4 saat sonra plazmatositler nodülün etrafına yapışmaya başlar. Nodül oluşumu yaklaşık 24 saatte tamamlanır ve tamamlanmış nodüllerin etrafı yassılaştırmış plazmatositlerle çevrilmiş olup, bakteriler ve granülosit kalıntıları içeren melanize olmuş bir merkeze sahiptirler [56, 130]. Nodül oluşumunda rol alan temel hemosit tipleri granülositler ve plazmatositlerdir ancak bazı araştırmacılar

melanizasyonda rol oynayan profenoloksidaz içeriğinden dolayı önositoidlerin de dolaylı olarak nodül oluşumunda rol aldığını savunmaktadırlar [57, 59, 131].

### 1.1.3.3. Enkapsülasyon

Hemosit aracılı enkapsülasyon böcek bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından biridir [21, 99, 101, 132]. Bu tepki yabancı patojenin kendinden olmayan olarak algılanması, bunun etrafında çok yoğun yassılaştırmış hemosit tabakalarının oluşması ve hemosit tabakalarında kısmi veya tam melanizasyon sonucu patojenin öldürülmesi şeklinde tarif edilmektedir [21, 99, 101, 132]. Enkapsülasyon tepkisi genellikle hemositler tarafından fagosite edilemeyecek kadar büyük olan partiküller için gerçekleştirilir [99, 132]. Enkapsülasyon hedefi biotik organizmalar (trematodlar, nematodlar, parazitoitler, parazit ve parazitoit yumurta ve larvaları, mantarlar) olabildiği gibi dışarıdan enjekte edilen deneysel objeler de (sephadex boncukları, naylon boncuklar, pamuk lifleri ) olabilmektedir [99, 131]. Kapsül morfolojileri genellikle taksonlar arasında benzerlik gösterir bununla beraber kapsüllerin oluşum hızı, rol alan hemosit tipleri ve kapsüllerin melanize olup olmaması gibi durumlarda türler arasında varyasyonlar görülebilir [21]. Yabancı organizma etrafında oluşturulmuş genel bir kapsül üç bölge içermektedir. En alt kapsül tabakası yaklaşık on hücre kalınlığında olup yassılaştırmamış ancak otoliz belirtileri gösteren granüler hücrelerden oluşmaktadır. Orta tabaka yaklaşık 20-40 hücre kalınlığında ve hücreler arası boşlukları elektron yoğunluğunda materyal ihtiva eden yassılaştırmış plazmatositlerden oluşmaktadır. En dış katman ise 1-10 tabaka kalınlığında granülositlerden oluşmaktadır [57, 59].

Amerikan hamam böceği *Periplaneta americana* (L.) (Dictyoptera: Blattidae) [133], çöl çekirgesi *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae) [133], büyük balmumu güvesi *G. mellonella* [130], lahana beyaz kelebeği *P. brassicae* [130], soya tırtılı *P. includens* [112, 134] ve tütün zararlısı *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) [135] ile yapılan araştırmalarda enkapsülasyon oluşumundaki genel süreç şu şekildedir:

- a) Hemositler tesadüfi hareketler ile veya doğrudan kemotaksisle yabancı objeyle temas kurarlar,

- b) Granülositler yabancı objeye tutunur ve degranülasyona başlar,
- c) Granülositlerden salınan granüller yabancı yüzeye ve hemositlere tutunur,
- d) Yine granülostlerden salınan maddeler diğer granülosit ve plazmatositleri enkapsülasyon bölgesine çeker,
- e) Ortama çekilen plazmatositler kapsüle yapışarak yassılaşırlar ve çok sayıda hücre tabakası oluştururlar,
- f) Hücreler arası boşluklar elektron yoğunluğunda materyalle dolar,
- g) Yabancı hedef objeye yapışan ilk granüler hücreler parçalanır,
- h) Oluşan kapsülün etrafı ince bir granülosit tabakasıyla kaplanır,
- i) Kapsül melanize olur [56].

Böcek içerisine giren patojenin yabancı olarak algılanmasını takiben kapsül oluşumu için ikinci basamak adezyon özelliği olmayan hemositlerin güçlü olarak adezyon özelliği kazanmalarındır [21]. Memelilerde immünositlerin adezyon ve göçü hem sitokinlerle hem de adezyon faktörlerinin aktivasyon ve taşınmasını sağlayan adezyon molekülleriyle sağlanır [21]. Böceklerde ise hemositler, epidermal dokular ve yağ doku hemosit adezyonunu sağlayan kaynaklar olarak bildirilmiştir [136, 137]. Bu faktörlerden birisi yaralanma esnasında epidermal hücrelerden salınan ve hemositlerin hücresele bir pıhtı oluşturmasını sağlayan hemokinin proteindir [138]. Diğer bir faktör kısmen saflaştırılmış ve lepidopter *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) larvasında hemositlerin enkapsülasyon davranışını başlattığı bildirilen enkapsülasyon başlatma faktörüdür [139]. *P. includens* larvasından elde edilen ve plazmatosit yayılma peptidi (PSP1) adı verilen sitokinlerin, plazmatositlerin yabancı yüzey üzerinde saniyeler içerisinde yayılmalarını sağladığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [140, 141]. PSP1 molekülü plazmatositlerin adezyon davranışını arttırmasına rağmen granülositlerin yayılmasını baskılamaktadır. PSP1 molekülünün kaynağının granülositler olduğunun düşünülmesi ve plazmatositler üzerinde farklı etkilere sahip olması, kapsül oluşumunun başlatılması ve bitirilmesinde bu molekülünün önemli rolü olduğunu düşündürmektedir [142]. Birçok farklı böcek türünde PSP1 molekülü homologlarının varlığının bilinmesi bu sinyal molekülünün plazmatosit aktivasyonunda yaygın bir rolü olduğunu göstermektedir [142]. Omurgalılarda hücre adezyonuna aracılık eden kaderinler, immüoglobulin süper ailesi, selektinler ve integrinler

olmak üzere dört ana reseptör ailesi belirlenmiştir. Hücre dışı bağlanma ligantları için integrinler en önemli reseptörler olarak bilinmektedir. Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar integrinlerin granüositler ve plazmatositler tarafından ifade edildiğini ve bu adezyon moleküllerinin kapsül oluşumunda anahtar rol oynadığını göstermektedir [21]. Enkapsülasyonun tamamlanması oluşan kapsülün etrafının ince bir granülosit tabakası ile kaplanması ile sona erer [21, 55, 112, 143]. Sonuç olarak kapsülün melanize olması bu sürece eşlik eder ve enkapsüle olan organizma çoğunlukla ölür [21, 52]. Enkapsüle olmuş hedef organizmanın ölümünden sorumlu olan faktörler çok iyi bilinmemekle beraber [21], boğulma, melanizasyon esnasında gerçekleşen profenoloksidaz aktivasyonu yoluyla lokal olarak oluşan sitotoksik kinonlar ve semikinonlar, serbest radikaller ve antibakteriyel peptitlerin ölüm ajanları olarak fonksiyon gösterdikleri savunulmuştur [52, 59, 144 -146].

## **1.2. Parazitoitlerin konak bağışıklık tepkilerinden korunması**

Parazitoitlerin konak böcek içinde gelişimi, biyokimyasal ve hormonal etkileşimler ve konak bağışıklık sisteminin baskılanması gibi çeşitli faktörlere bağlıdır [147]. Bağışıklığın baskılanması parazitoitlerin başarılı olarak gelişebilmelerine yardımcı olan karmaşık mekanizmalarla düzenlenir [148]. Parazitoit böcekler konaklarında var olan bağışıklık tepkilerinden korunmak için çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir [21, 39, 62, 104, 149]. Bu stratejiler:

### **Enkapsülasyondan pasif olarak kaçınma ve**

- ✓ fonksiyonel bağışıklık sisteminden yoksun konak evrelerinde ovipozisyon ve gelişme
- ✓ konak bağışıklık hücrelerinin ulaşamadığı bir yere ovipozisyon
- ✓ yabancı olarak tanımlanamayan yüzey faktörlerinin varlığı

### **Aktif olarak enkapsülasyonu önleme**

- ✓ konak hemositlerinde apoptozisi tetikleme
- ✓ konak hemosit fonksiyonunun bozulması

olarak iki grupta toplanabilir [21, 149]. Başışıklık tepkisi gösteremeyen konak yumurtalarına yumurta bırakan parazitoitler, başışıklık sistemi olmayan konak evresine yumurta bırakma ve gelişme için iyi bir örnektir [21]. Diğer yandan, konak vücudunun dışına ovipozisyonunu gerçekleştiren ve larvaları konak vücudunun dışında kalacak şekilde beslenen ektoparazitoitler de konak başışıklık hücreleri ve efektör molekülleri ile parazitoit oğul dölü arasındaki temasın engellendiği bir yerde üremeye örnek verilebilir. Parazitoitlerin büyük çoğunluğu ise konaklarının tam bir başışıklık fonksiyonuna sahip olduğu larva döneminde konak içinde gelişimini sürdürür [21]. Bazı endoparazitoitler dolaşımdaki hemosit enkapsülasyonundan korunmak için sinir gangliyonu gibi organlarda gelişimlerini sürdürürler ancak büyük çoğunluğu konak vücut boşluğunda gelişerek hemositlere maruz kalırlar [21]. Endoparazitoit yumurta ve larvaları genellikle konak tarafından yabancı olarak tanımlanmayan yüzey faktörlerine sahiptirler [150]. Örneğin *Cotesia* cinsine ait parazitoit türlerin yumurtalarını kaplayan proteinlere hemositler yapışmamaktadır [151, 152].

Diğer yandan, parazitoit türler konak başışıklık savunma sistemini aktif olarak baskılayan yöntemler de geliştirmişlerdir [55, 153]. Konak toplam ve farklı hemosit sayılarında meydana gelen değişimler, enkapsülasyonun baskılanması, hemosit yayılma davranışlarının inhibisyonu, dolaşımdaki hemositlerde apoptozis ve hücre döngüsünün baskılanması, parazitlenme sonucu konak başışıklık sisteminde görülen değişimlerdir [154]. Birçok durumda ovipozisyon öncesi veya esnasında ergin dişi parazitoit tarafından ovipozitör aracılığıyla konak içine bırakılan salgılar konak fizyolojisini düzenlemekte ve başışıklık sistemini baskılamakta etkili olmaktadır [21, 35, 36, 39, 155]. Endoparazitoit kaynaklı kaliks sıvısı, zehir, virüs benzeri partiküller (VLPler) ve/veya PDVler gibi ovipozisyon esnasında konağa enjekte edilen ve konak hemositlerinin hem sayısına hem de davranışlarına, özellikle de yapışma ve dağılmalarına etki eden faktörler konak başışıklık sistemini zayıflatmaktadır [21, 39, 156 - 159]. Kaliks sıvısı içerisinde bulunan yumurtalık proteinleri ovipozisyon esnasında dişilerin üreme kanalından konak vücuduna geçerek konak başışıklık tepkilerinde rol alan hemositlerin [21] aktin hücre iskeletini bozarlar ve parazitoit yumurtalarının konak hemositleri tarafından enkapsülasyonunu engellerler [160]. Halkasal yapıda çift zincirli DNA genomuna sahip olan PDVleri

şu ana kadar sadece bazı ichneumonidae ve braconidae familyalarına ait türlerde tespit edilebilmiştir [46, 161, 162]. Konak dokularında gen ekspresyonu ile sentezlenen PDV proteinleri konak bağışıklık sistemini baskırlar [141]. Konak fizyolojisinin ve gelişiminin düzenlenmesinde parazitoit zehir bileşenlerinin farklı etkilerinin olduğu tespit edilmiştir [25, 163 - 166]. Ovipozisyon öncesinde dişi parazitoitin zehiri ile konağını felç etmesi, yumurta bırakırken konak tür tarafından rahatsız edilmemesi bakımından kendisine avantaj sağlar. Zehir bileşenlerinin ölümcül etkileri olsa da, öldürücü doz altında konağa verilen dozlarda konakta görülen felç olma, besin tüketiminin azalması, bağışıklık sisteminin zayıflaması ve endokrin sistemde meydana gelen değişimler [25, 163 - 165] parazitoit oğul dölünün gelişmesi için uygun şartları oluşturur. Yılan, akrep, örümcek, salyangoz [167, 168] ve diğer böcek takımlarına ait türlerde [169] olduğu gibi Hymenoptera takımındaki parazitoit türlerin zehir içeriğinde de çok sayıda nörotoksik etkili bileşenin mevcut olduğu belirlenmiştir [170, 171]. Bu bileşenler, enzimatik ve litik aktiviteden yoksun, birçoğu peptit ve protein yapısında ve hücre zarı reseptörlerini spesifik olarak tanıma ve bağlanma affinitesine sahip moleküllerdir. Eşsiz farmakolojik özellikleri sayesinde, hedef sinir hücreleri ve sinir-kas bağlantıları üzerinde organizmanın hareketsiz, uyuşuk hale geçmesi ve felç olması ile sonuçlanan etkilere sebep olurlar [167, 172]. Parazitoit salgısı içerisinde bulunması muhtemel bu bileşenlerin nispi önem ve miktarları ise parazitoit türlere göre farklılık gösterebilmektedir [46].

Farklı parazitoit türler ile yapılan bazı çalışmalarda, sadece kaliks sıvısı ve PDVlerin konak gelişimini etkilediği [160, 165, 173], diğer bazı çalışmalarda ise, konak gelişimindeki değişiklikler için zehirin de mutlaka bulunması gerektiği veya zehirin sinerjik etki yaratarak kaliks sıvısının etkisini arttırdığı ifade edilmiştir [163, 166, 174]. Yapılan bir çalışmada PDV içeren parazitoit *Diadegma semiclausum* (Helen) (Hymenoptera: Ichneumonidae) tarafından parazitlenen konak *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) larvalarında toplam hemosit sayısında parazitlemeyi takiben ilk 12 saatlik periyotta ani bir düşüş gözlenmiştir [154]. Diğer bir çalışmada *Microplitis demolitor* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae) PDV'leri konak *P. includens* larvalarında granülositlerin sayısını azaltarak konak toplam hemosit sayılarında azalmaya neden olmuştur [175]. Zehir salgısında virüs benzeri



partiküller içeren *Meteorus pulchricornis* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae) virüs benzeri partiküllerinin (VLP) konak *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae)'ya enjeksiyonunu takiben hemolenfteki granülosit sayıları azalmış, buna bağlı olarak da toplam hemosit sayıları azalmıştır [176]. Konak bağışıklık sisteminin zayıflatılmasında endoparazitoit zehirinin rolü ise birçok durumda tam olarak aydınlatılamamıştır. Parazitoit zehirinin Diptera larvalarının hemositleri üzerine morfolojik etkileri gösterilmiş, parazitlenme sonrası konakta hemosit sayısının azaldığı tespit edilmiştir [103, 177]. *Cotesia kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) zehir ve PDVlerinin konak *P. separata* hemositlerine etkilerinin belirlendiği bir çalışmada hem zehir hem de PDVlerinin ayrı ayrı hemosit sayısını azalttığı belirtilmiştir [178]. Başka bir çalışmada *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Braconidae) kaliks sıvısının konak bağışıklık tepkilerini baskılamada temel bir rolünün olduğu ancak zehirin konak hemositleri üzerine sınırlı etki gösterdiği muhtemelen zehirin kaliks sıvısı veya PDVlerinin etkisini arttırdığı belirtilmiştir [179]. Mochiah ve arkadaşları [180] konak *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae)'da toplam hemosit sayılarının ve plazmatosit sayılarının parazitoit *Cotesia sesamiae* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) parazitlenmesi sonucu azaldığını belirtmişler ve zehir salgısının bu immün baskılamada tek başına yeterli olmadığını savunmuşlardır. PDV ve teratositlerinin konak immün sistemini baskılamada temel rolü olduğu düşünülen parazitoit *C. plutellae*'nin parazitlenmesine bağlı olarak, konak *P. xylostella*'da toplam hemosit sayıları parazitlemeyi müteakip azalmış ve bu azalma hem granülosit, hem de plazmatosit sayısında meydana gelen azalmadan kaynaklanmıştır [181]. Bu koinobiont parazitoitlerin zehir salgıları konakları üzerinde genellikle kısmi felç etkisi yapmaktadır [182] ve birçok durumda konak bağışıklık sistemini tek başına baskılamak yerine kaliks sıvısı veya PDVlerine yardımcıdır [22, 24, 147, 157].

Koinobiont parazitoitlerin aksine idiobiont türler konaklarını kalıcı olarak felç ederek kendi nesillerinin beslenip gelişmesine uygun hale getirirler [7]. *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) idiobiont bir parazitoittir ve simbiyotik virüslerden yoksundur. İdiobiont endoparazitoitlerin zehir ve/veya parazitlenmesinin konak bağışıklık tepkilerini baskılamadaki rolü ve konak hemolenf profiline ve hemositlerine etkileri ayrıntılı bir şekilde çalışılmamıştır. Bununla

beraber simbiyotik virüslerden yoksun olan idiobiont endoparazitoit zehirinin konak bağışıklık tepkilerini baskılamada tek başına etkili olduğunu gösteren çok az sayıdaki çalışma literatürde mevcuttur. Örneğin *Pimpla hypocondriaca* (Retzius) (Hymenoptera: Ichneumonidae) zehirinin konak hemositleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu ve zehirin toplam hemosit sayısını azaltarak hemosit aracılı konak bağışıklık tepkilerini baskıladığı gösterilmiştir [39]. Başka bir çalışmada endoparazitoit *Pteromalus puparum* (L.) (Hymenoptera: Pteromalidae) tarafından parazitlenen *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae)'de zehir aktivitesinin sonucu olarak toplam hemosit sayısı ve plazmatositlerin sayısı azalırken granülosit sayıları artmış ve hemosit davranışlarının değiştiği belirtilmiştir [50].

Hemositlerde, yabancı organizmalara veya toksik maddelere karşı bağışıklık tepkilerini ortaya koyarken programlanmış hücre ölümlerinin (apoptozis) meydana geldiği [183, 184], hemosit şekillerinde ve mitotik indekste farklılaşmalar olduğu [101, 178] belirlenmiştir. Apoptozis geçiren hemositlerde tipik olarak hücrede küçülme, hücre zarında kabarcıklaşma, kromatinde yoğunlaşma ve DNA'nın parçalanması dikkat çekmektedir [183, 185]. Hücre ölümü konak – parazitoit ilişkisi içinde genel bir özelliktir ve apoptozis ve/veya onkozis parazitoit larvasının konak içinde başarılı bir şekilde gelişebilmesi için konak uygunluğunun (ör: gelişimin durması, konak bağışıklık sisteminin baskılanması, konak metabolizmasının indirgenmesi veya yeniden düzenlenmesi, konak lipitlerinin larval beslenme için salınması) düzenlenmesinde oldukça önemli görünmektedir [51]. Parazitoit kaynaklı salgıların konak hemosit apoptozisine neden olduğunu gösteren az sayıda çalışma literatürde mevcuttur ve bu çalışmalarda genel olarak parazitoit kaynaklı PDV veya VLP'e odaklanılmıştır [175, 176]. *P. includens*'de parazitoit *M. demolitor* PDV'lerinin apoptozise neden olarak granüler hücrelerin sayısını azalttığı tespit edilmiştir [175]. Başka bir çalışmada, parazitoit *M. pulchricornis* zehirinde bulunan virüs benzeri partiküller konak *P. separata*'ya enjekte edildiğinde bazı hemositlerin yüzeylerinde kabarcıklar oluşarak şekillerinin bozulduğu ve kromatinlerinin yoğunlaşp parçalanarak tipik apoptotik hücre görünümü kazandıkları belirlenmiştir [176]. *C. kariyai* tarafından parazitlenen konak *P. separata*'da, PDV'lerin aktivitesine bağlı olarak dolaşımdaki hemositlerde apoptozis gözlenmiştir [178]. Ancak VLP veya PDV enfeksiyonlarına bağlı olarak oluşan apoptotik hücresel yollar

henüz tam olarak bilinmemektedir [51]. Bunun yanında PDV ve virüs benzeri partiküllerden yoksun olan parazitoitlerde zehir veya parazitlemenin konak hemositlerinde apoptozise neden olduğunu gösteren çalışmalar çok azdır. Örneğin simbiyotik virüslerden yoksun olan *P. hypocondriaca* zehiri konak *Lacanobia oleracea* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) hemositlerinde apoptozise neden olmuş ve zehir dozu arttırıldıkça dolaşımdaki apoptotik hemositlerin oranının arttığı belirtilmiştir [186]. Başka bir çalışmada bir ektoparazitoit olan *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) zehirinin, kültüre alınmış böcek hücrelerinde  $Na^+$ 'na karşı plazma membran geçirgenliğini arttırdığı ve hücrelerin şişerek onkoz yoluyla öldüğü gösterilmiştir [187].

Böceklerde dolaşımdaki hemositlerin devamı, hematopoietik organlardan ve dolaşımdaki hemositlerin mitoz bölünmeleri ile sağlanmaktadır [121, 188]. *G. mellonella*, *B. mori* ve *Euxoa declarata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) ile yapılan çalışmalarda dolaşımdaki hemositlerin % 1-8 oranında mitotik fazda olduğu tespit edilmiştir [121, 124, 189, 190]. Parazitlenme esnasında dişi parazitoit tarafından konak içerisine aktarılan salgıların konak hemositlerinde mitotik indekse etkileri ile ilgili sadece bir çalışma bulunmuştur [178]. *C. kariyai* PDV ve zehir enjeksiyonunu müteakip konak *P. separate* hemositlerinde mitoz bölünmenin durduğu belirtilmiştir [178]. Ancak PDV'lerinden yoksun olan endoparazitoit zehiri veya parazitlemesinin konak hemositlerinde mitotik indekse etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Konak böceğin fizikokimyasal bariyerlerini aşıp vücut boşluğu içerisine giren ve gelişimini burada sürdüren endoparazitoit yumurta ve larvaları, konağın kendinden olmayanı algılaması sonucu konak doğal bağışıklık savunması riski altındadır [37, 39, 50]. Parazitoitler yumurta ve larvalarının konak hemositleri tarafından enkapsülasyonunu engellemek için çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Birçok durumda ovipozisyon esnasında ergin dişi parazitoit tarafından konak içine bırakılan salgılar aktif olarak enkapsülasyonu önlemede etkili olmaktadır [39, 132, 176]. Larval endoparazitoit *M. pulchricornis* tarafından parazitlenen konak *P. separate*'da hemositlerin enkapsülasyon davranışı önemli derecede azalmıştır [176]. Aynı çalışmada virüs benzeri partiküllerin konağa enjekte edilmesi enkapsülasyonu

baskılamış ancak zehir enjeksiyonu etki göstermemiştir [176]. *Ostrinia furnacalis* (Guenee) (Lepidoptera:Pyralidae) larvalarına *Macrocentrus cingulum* (Brischke) (Hymenoptera: Braconidae) zehir ve yumurtalık proteinleri enjekte edildiğinde zehirin tek başına enkapsülasyonu baskılamada etkili olmadığı ancak yumurtalık proteinleri ve zehir karışımının hemositlerin enkapsülasyon davranışını baskıladığı belirtilmiştir [191]. Başka bir çalışmada *D. semiclausum* parazitlenmesine bağlı olarak konak *P. xylostella* hemositlerinde, parazitlemeyi takiben 24 saat sonra hemositlerin enkapsülasyon davranışlarında baskılanma gözlenmiştir [154]. *C. plutella* tarafından parazitlenen ve parazitlenmemiş konak *P. xylostella* larvasında enkapsülasyon araştırılmıştır [181]. Buna göre boncuk enjeksiyonunu takiben 24 saat sonra parazitlenmemiş larvada boncuk etrafında melanize olmuş enkapsülasyon materyali birikirken parazitlenmiş larvada sadece birkaç hemosit boncuklara yapışmış ve enkapsülasyon baskılanmıştır [181]. Simbiyotik virüslerden yoksun olan *P. hypochondriaca* zehiri konak *L. oleracea* larvasında enkapsülasyonu % 50 veya daha fazla oranda baskılamıştır [39]. Enkapsülasyon davranışının gözlemlendiği çalışmalarda genellikle larval endoparazitlere odaklanılmış, pupal enkapsülasyon tepkileri ile ilgili çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. *P. hypochondriaca* zehirinin konak *L. oleracea* pupuna enjeksiyonunu takiben, 1/5 kese eşdeğeri zehir pupal enkapsülasyonu neredeyse tamamen baskılamaya yeterli olmuştur [192]. VLP veya PDV'lerinden yoksun olan *P. puparum* zehir ve parazitlenmesinin konak *P. rapae* pup hemositlerine etkilerinin belirlendiği bir çalışmada enkapsülasyon oranı kontrol grubunda % 78 iken, zehir tatbik edilmiş gruplarda bu oran % 30'a düşmüştür [50]. *P. turionellae* zehir ve parazitlenmesinin konak *G. mellonella* larval ve pupal evresinde hemosit enkapsülasyonuna etkileri ile ilgili bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

Çalışmamızda, konak tür olarak kullanılan büyük balmumu güvesi *G. mellonella* arıcılar tarafından çok iyi bilinen zararlı bir kelebek türüdür. Arı bulunan her yerde yaşarlar ve dişileri yumurta bırakmak için akşam karanlığında arı kovanlarına girerler. Kovan içinde yumurtadan çıkan larvalar bal peteklerine büyük oranda zarar verirler. Larvalar peteğin orta taban kısmında tüneller açarak yıkıntı ve döküntüler meydana getirmek sureti ile zararlı olurlar [193]. Arıcılar, larvaların kovana zarar vermelerini önlemek için genellikle zehirli kimyasallar (pestisitler)

kullanırlar. Söz konusu maddelerin bilinçsiz ve kontrolsüz şekilde kullanılması hem ekolojik dengenin bozulmasını hem de çevre kirliliğini hızlandırmaktadır [2, 194]. Bu durumda, en zararsız koruma yöntemi olan biyolojik kontrol yöntemlerinin önemi iyice artmaktadır.

*P. turionellae* çok sayıda zararlı Lepidopter türün prepup ve pupunda soliter, idiobiont ve endoparazitoit olarak gelişen bir türdür. *P. turionellae*'nın biyolojisi [195 - 197], üreme özellikleri [198], yetiştirilebileceği sentetik besin ortamı ve sentetik besin ile ilgili özellikler [198 - 201], yağ asidi bileşimi [202], glikojen miktarındaki değişimler [203], larvaların anal salgılarının kimyası ve fizyolojik etkileri [204] ve zehir bezi ile bir dereceye kadar zehir kimyası [170, 205, 206] araştırılmıştır. Ayrıca, besindeki değişikliklerin *P. turionellae*'da yaşam ve gelişmeye [207 - 211], yağ asidi bileşimi [201], glikojen sentezi [212 - 214] ve protein miktarına [208, 212, 215] etkileri ile düşük sıcaklığın ergin dişi ve puplarda meydana getirdiği fizyolojik ve biyolojik etkiler [216 - 219] de belirlenmiştir. Yapılan toksikolojik çalışmalarda ise, değişik ağır metallerin [220 - 222], çeşitli insektisit [102, 223 - 225] ve herbisitlerin [226, 227] *P. turionellae* üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

*P. turionellae* dişilerinin zehir bezinin morfolojik ve histolojik yapısı üzerine yapılan çalışmalarda [205, 206], bez hücrelerinin yapısına bağlı olarak zehir içeriğinin protein tabiatında olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, dişilerin zehir analizlerinde protein dışında karboksilik asit ve fosforlu bileşiklerin bulunduğu, fakat karbohidratların bulunmadığı ortaya konmuştur [205]. *P. turionellae* zehir içeriğinin geniş moleküler ağırlıkta peptit ve proteinlerden oluştuğu ve içerikte biyolojik olarak aktif moleküllerden melittin, apamin, noradrenalin, serotonin, histamin ve fosfolipaz B'nin varlığı gösterilmiştir [170, 228]. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, parazitoit zehrinin lepidopter ve dipter konaklarda parolitik, sitotoksik ve sitolitik etkileri belirlenmiştir [228]. Biyolojik olarak aktif moleküller içeren *P. turionellae* zehrinin, konak *G. mellonella*'nın hücrel bağışıklık tepkilerinde rol alan hemositlerine etkileri hakkında ise literatürde ayrıntılı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez çalışması kapsamında, pup endoparazitoiti *P. turionellae* ile zararlı konak türü *G. mellonella* puplarının arasındaki parazitoit-konak etkileşimi modelinden yola

çıkılarak zehir enjeksiyonu ve doğal parazitlemenin konak hemositlerinin sayısına ve enkapsülasyon davranışlarına etkileri belirlendi. Ayrıca, parazitoit zehir enjeksiyonu ve parazitlemesine bağlı olarak konak hemositlerinde mitotik aktivite ve apoptotik indekste meydana gelen değişiklikler de tespit edildi. *P. turionellae*'nin arıcılık ve ziraatte olumsuz sonuçlar yaratan birçok zararlı konak böcek türü üzerinde biyolojik ajan olarak önemli olduğu göz önüne alındığında, parazitoit zehirinin konak bağışıklık sistemi üzerinde etkilerinin belirlenmesinin ileride rekombinant biyolojik insektisitlerin üretimi dâhil olmak üzere biyolojik kontrol uygulamalarında yarar sağlayacağı değerlendirilmektedir. Bu bakımdan, *P. turionellae* zehir enjeksiyonunun ve doğal parazitlemenin konak hücrel bağışıklık sisteminin savunma reaksiyonlarında iş gören hemositler üzerine karşılaştırmalı etkisini ortaya koyan bu çalışmanın, konak regülasyonunda parazitoit salgılarının rolünü daha detaylı olarak anlaşılmasına yardım edeceği, ayrıca, elde edilen verilerin böcek biyokimyası, fizyolojisi, gelişim biyolojisi, biyolojik kontrol ve insan sağlığı ile ilgili çalışmalara da yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. MATERYAL VE METOT

Konak ve parazitoit kültürlerinin yetiştirilmesinde 1,45x2,00x3,55 boyutlarında bir oda laboratuvar olarak kullanıldı. Kültürlerin yetiştirilmesi ve tüm deneyler süresince, laboratuvarında  $25 \pm 2$  °C sıcaklık, %  $60 \pm 5$  bağıl nem ve 12:12 saat (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot şartları devam ettirildi. Laboratuvarında sıcaklık 9000 BTU klima ve termostatlı radyatör kullanılarak, nispi nem ise radyatörün her iki yanına asılan içi su dolu plastik kaplarla ve gerektiğinde laboratuvar zeminine su serpilerek sağlandı. Sıcaklık ve nem değerleri maksimum-minimum termometre, higrometre ve termohigrografla devamlı olarak takip edildi. Aydınlık ve karanlık süresi fotoperiyot cihazları ile ayarlandı.

### 2.1 Konak Kültürleri

Konak türün süksesif kültürleri laboratuvarımızda üretimi sürdürülen *G. mellonella* erginleri kullanılarak oluşturuldu. Süksesif kültürlerin oluşturulmasında daha önce doğal peteğe ilaveten besin desteği olarak kullanılan ve Bronskill [229]'den yararlanılarak hazırlanan yarı sentetik besin kullanımı yerine larvaların doğal ortamına yakın olması amacıyla sadece doğal koyulaşmış petek kullanıldı. Stok kültürden alınan 2 dişi ve 2 erkek ergini, içerisinde dişilerin yumurta bırakması amacıyla bir miktar doğal koyulaşmış petek bulunan 5 lt'lik cam kavanozlara bırakıldı. Kavanozların ağzı hava sirkülasyonunu önlemeyecek şekilde bez ve üstüne delikler açılmış kapaklar (larvaların bezi delip kaçmalarını önlemek için) ile kapatıldı. Larvaların beslenebilmesi amacıyla populasyon yoğunluğuna bağlı olarak, kavanozlara zaman zaman yeterli miktarda petek ilave edildi. Bu şekilde elde edilen konak larva ve pupları, parazitoit ve konak kültürlerinin devamında ve deneylerde kullanıldı. Ayrıca, konak kültürlerinin hızlı bir şekilde üretilmesi ve pup elde etmek için gerektiğinde 30-35°C'ye ayarlanmış etüvler kullanıldı.

## 2.2 Parazitoit Kùltùrleri

Deneylerde parazitoit olarak idiobiont, soliter ve pup endoparazitoiti *P. turionellae* kullanıldı. *P. turionellae* stok kùltürünün özünü laboratuvarımızda yetiştirilmekte olan *P. turionellae* erginleri oluşturdu. Besin olarak doğal petek kullanılarak yetiştirilen konak larvaları son larva evrelerine doğru kùltürden alınıp içerisinde sadece katlanmış kağıt bulunan kavanozlara bırakıldı. Kavanozlar üzeri delinmiş kapaklar ile kapatılarak konak stok kùltürlerinin yetiştirildiği laboratuvara alındı. Larvalardan elde edilen puplar, *P. turionellae* stok kùltürünün hazırlanmasında kullanıldı. Parazitoit üretimi için konak pupları *P. turionellae* ergin dişileri tarafından parazitletildi. Elde edilen ergin bireyler parazitoit kùltürünün devamında, deney gruplarının oluşturulmasında, zehir elde edilmesinde ve parazitlemede kullanıldı. Parazitoit kùltürleri, konak kùltürleri ile aynı laboratuvar koşullarında tutuldu. *P. turionellae* erginleri her gün % 30 bal çözeltisi ve iki günde bir konak pup hemolenfi ile beslendi.

## 2.3 *G. mellonella* Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi

*G. mellonella*'da hemosit tiplerinin belirlenebilmesi amacıyla 15 – 20 g ağırlığında son evre larvalar ve 8 – 10 g ağırlığındaki puplar kullanıldı. Hemolenf elde edebilmek için son evre larvalar -20 °C'de 3 dakika bekletilerek hareketlerinin yavaşlaması sağlandı, puplarda uyuşturma uygulamasına gerek duyulmadı. Larva ve puplar % 95'lik etanol ile silindikten sonra, larvalar birinci arka bacak üstünden, puplar ise karın kısmından ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinip mikropapiller tüp (SIGMA) yardımıyla 5 µl hemolenf elde edildi. Hemolenf melanizasyona izin vermeden hızlı bir şekilde daha önce alkolle temizlenmiş lamlar üzerine alınarak yayıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Lamaların kurummasını takiben hemositlerin fiksasyonu için lamlar 5 dakika süre ile metanol içinde bekletildi ve metanol üzerlerinden akıtılarak kurumaya bırakıldı. Hemositlerin boyanabilmesi için taze olarak hazırlanan Giemsa boyama çözeltisi kullanıldı.



### ***Giemsa Boyama Çözeltisinin Hazırlanması:***

Boyama çözeltisinin hazırlanabilmesi için, 3 ml Giemsa boya solüsyonu (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution), içerisinde 57 ml PBS (pH = 7,4) bulunan lam boyama kaplarına yavaşça damlatılarak karıştırıldı ve 10 dakika bekletildi.

Tespit işleminden sonra kurutulan lamlar giemsa boyama çözeltisi içine alınarak boyanmaları sağlandı. Preperatlar Giemsa boya çözeltisi içinde 10-15 dakika bekletildikten sonra PBS ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlar entellan ile kapatılarak Olympus BX51 marka mikroskopta incelendi ve hemosit tipleri belirlenerek fotoğrafları çekildi.

Hemosit tiplerinin belirlenebilmesi için ayrıca faz - kontrast mikroskobu da kullanıldı. Yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen hemolenf doğrudan lam üzerine yayıldı ve Olympus BX51 marka faz – kontrast özelliği olan mikroskopta incelendi.

### **2.4 *P. turionellae* zehir dozlarının oluşturulması, enjeksiyonu ve parazitleme**

*P. turionellae* dişilerinin zehir bezi içeriğinin konak pupal hemositlerine etkilerinin belirlendiği deneysel çalışmalarda 10-20 günlük *P. turionellae* dişilerinin zehiri kullanıldı. Parazitoit ovipozitörleri kavranıp çekilmek suretiyle böcekten ayrıldı ve zehir keseleri stereo mikroskop altında diseksiyon iğneleri ile çıkartılarak içerisinde fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS Sigma pH = 7,4) bulunan ve buz üzerinde bekletilen ependorf tüpleri içine alındı. Zehir enjeksiyonu deneylerinde parazitoit zehirinin daha önceki çalışmada [228] belirlenen LD<sub>99</sub> [LD<sub>99</sub> = 0,06 (0,057 – 0,080) kese eşdeğeri zehir (KEZ) / pup] değeri altındaki farklı dozları kullanıldı.

Zehir dozları;

1 Dişi Zehir Kesesi	→	100 µl PBS içine	→	0,05 KEZ
1 Dişi Zehir Kesesi	→	250 µl PBS içine	→	0,02 KEZ
1 Dişi Zehir Kesesi	→	500 µl PBS içine	→	0,01 KEZ
1 Dişi Zehir Kesesi	→	1000 µl PBS içine	→	0,005 KEZ

olacak şekilde hazırlandı. Diseksiyon iğnesi ile zehir keseleri delinerek içeriğın farklı derişimler için hazırlanan farklı miktarlardaki PBS çözeltilerine geçmesi sağlandı ve zehir keseleri solüsyondan uzaklaştırıldı. Hazırlanan ependorf tüpleri içerisindeki farklı dozlardaki zehir solüsyonları bekletilmeden zehir enjeksiyonu deneylerinde kullanıldı.

Pupal evrenin farklı dönemlerinde hemosit sayı ve morfolojilerinin değişebileceğı göz önüne alınarak tüm deney gruplarında 1-2 günlük *G. mellonella* pupları kullanıldı. Her KEZ değeri için puplara 10 µl'lik Hamilton marka mikroenjektör ile 5 µl zehir solüsyonu enjekte edildi. Enjeksiyon yeri olarak pupta abdomenin son iki segmentinin arası tercih edildi. Enjeksiyon işleminden sonra hemolenf kaybını engellemek için enjeksiyon bölgesi vazelin (Petroleum jelly, Sigma) ile kapatıldı [39].

Farklı kese eşdeğeri zehir dozlarının konak larval hemositlerine etkilerinin belirlendiğı deneylerde parazitoit zehirinin daha önceki çalışmada [228] belirlenen LD<sub>99</sub> [LD<sub>99</sub> = 1,1 (0,66– 3,64) kese eşdeğeri zehir (KEZ) / larva] değeri altındaki farklı dozları seçildi.

Zehir dozları;

10 Dişi Zehir Kesesi	→	100 µl PBS içine	→	0,5 KEZ
2 Dişi Zehir Kesesi	→	100 µl PBS içine	→	0,1 KEZ
1 Dişi Zehir Kesesi	→	100 µl PBS içine	→	0,05 KEZ
1 Dişi Zehir Kesesi	→	250 µl PBS içine	→	0,02 KEZ

olacak şekilde hazırlandı. 10 µl'lik Hamilton mikroenjektör yardımıyla her KEZ dozu 5'er µl olacak şekilde larvalara birinci arka bacak üstünden enjekte edildi ve enjeksiyon bölgesi vazelin ile kapatıldı.

Parazitlemenin *G. mellonella* pupal hemositlerine etkilerinin belirlendiği çalışmalarda 1-2 günlük puplar parazitlemeleri için *P. turionellae* dişilerine sunuldu. Her bir pupa tek bir parazitoit dişisinin yumurta bırakması sağlandı ve parazitlendiği gözlenen puplar ikinci bir parazitleme olmaması amacıyla ortamdan ayrıldı. *G. mellonella* larvalarında parazitleme gerçekleştirilemediği için parazitlemenin konak hemositlerine etkileri sadece pupal evrede belirlendi.

Kontrol grupları için boş enjeksiyon yapılmış, 5 µl PBS enjekte edilmiş ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış normal pup ve larvalar kullanılmak üzere üç ayrı kontrol serisi oluşturuldu. Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu diğer deney gruplarında olduğu gibi pupta abdomenin son iki segmenti arasından, larvada ise birinci arka bacak üzerinden yapıldı ve hemolenf kaybını engellemek için enjeksiyon bölgesi vazelin ile kapatıldı.

## **2.5 *P. turionellae* zehiri ve parazitlemesinin konak toplam hemosit sayısına etkileri**

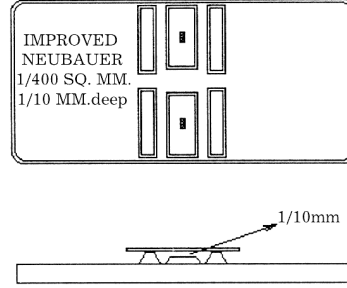
*P. turionellae* zehir enjeksiyonu ve parazitlemesinin konak pupu toplam hemosit sayısına etkilerinin belirlendiği çalışmalarda 0,05, 0,02, 0,01 ve 0,005 KEZ

dozları taze olarak hazırlanıp bekletilmeden puplarda abdomenin son iki segmenti arasına enjekte edildi ve enjeksiyon bölgesi vazelin ile kapatıldı. Parazitleme bir dişi parazitoit başına bir pup verilmek suretiyle gerçekleştirildi. Enjeksiyonu ve parazitlemeyi takiben 4, 8 ve 24 saat sonra puplardan hemolenf alınıp hemosit sayıları belirlendi. Zehir enjeksiyonunun *G. mellonella* larvası toplam hemosit sayılarına etkilerinin belirlenmesi için 0,5, 0,1, 0,05 ve 0,02 KEZ dozları hazırlanıp bekletilmeden larvalarda birinci arka bacak üzerinden enjekte edildi ve enjeksiyon bölgesi vazelin ile kapatıldı. Enjeksiyonu takiben 4, 8 ve 24 saat sonra larvalardan hemolenf alınarak hemosit sayıları belirlendi.

Kontrol gruplarını herhangi bir işleme tabi tutulmamış, boş enjeksiyon yapılmış ve PBS enjeksiyonu yapılmış konak larva ve pupları oluşturdu. Deney grupları oluşturulurken herbir zehir dozu, parazitleme ve kontrol grupları için 15'er pup ve larva kullanıldı. Enjeksiyon yapılmış ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış 15'er pup ve larva beşerli gruplara ayrılarak 4, 8 ve 24 saatlik toplam hemosit sayıları belirlendi. Parazitlemenin *G. mellonella* toplam hemosit sayılarına etkileri ise yine 15'er pup kullanılarak 4, 8 ve 24 saat sonra belirlendi. Tüm KEZ dozları, parazitleme ve kontrol gruplarını içeren deneyler üç kez tekrar edildi.

Farklı deney ve kontrol gruplarında toplam hemosit sayılarının belirlenebilmesi için puplar karın kısımlarından ince uçlu iğneyle delindi ve 4 µl hemolenf mikropipet tüp (Sigma) yardımıyla alındı. Elde edilen hemolenf örneği buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 20 µl antikoagulan (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na<sub>2</sub>EDTA ve 0,041 M Sitrik asit, pH = 4,5) [109, 178, 181] bulunan ependorf tüplerine aktarıldı. 1: 6 oranında seğreltilmiş hücre süspansiyonu mikropipet yardımıyla birkaç kez çekilip bırakılmak suretiyle karıştırıldı ve hücre süspansiyonundan 10 µl mikropipet ile çekilerek 0,100 mm derinliğe sahip Neubauer hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer; Superior, Germany) (Şekil 2.1) yüklendi. Larval hemolenf örneği birinci arka bacak üzerinden yine mikropipet tüp yardımıyla elde edildi. Larvada hemosit sayılarının pupa göre fazla olmasından dolayı 4 µl hemolenf 36 µl antikoagulan içerisine alınarak 1: 10 oranında seyreltme yapıldı ve Neubauer hemositometresine yüklendi. Hemositler Olympus

BX51 marka Faz – Kontrast mikroskopunda sayıldı ve bir mililitre hemolenfteki hemosit sayısı olarak belirlendi.



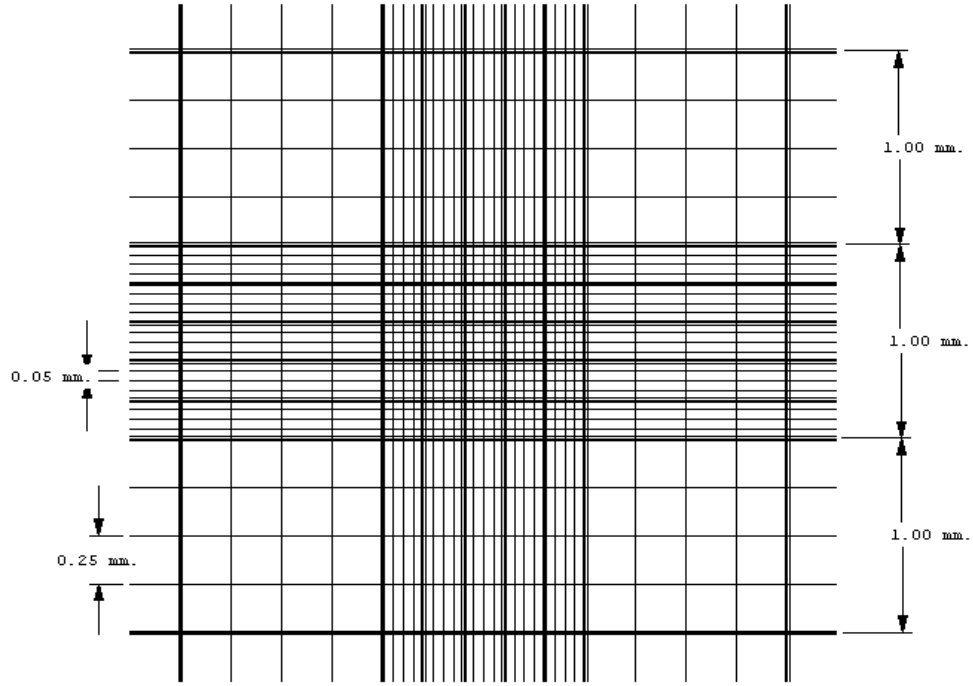
**Şekil 2.1.** Neubauer Hemositometre Lamı

Neubauer hemositometresi üzerinde iki farklı sayım alanı bulunan ve bu sayım alanlarının bir çukurlukla birbirinden ayrıldığı sayma lamıdır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane  $1 \text{ mm}^2$ 'lik bölümler (büyük kareler) bulunur. Bunlar 16 tane orta büyüklükte kareye ayrılmıştır ( $1/4 \times 1/4 = 1/16 \text{ mm}^2$ ). Ortada bulunan büyük kare ise 25 tane orta büyüklükte kareye ayrılmıştır. Orta büyüklükteki karelerin etrafı çift çizgi ile çevrilmiştir. Herbir orta kare de 16 küçük kareye bölünmüştür (Şekil 2.2). Böylece, ortadaki alanda 25 tane orta kare, 400 tane küçük kare vardır. Bir küçük karenin alanı  $1/20 \times 1/20 = 1/400 \text{ mm}^2$ 'dir. Sayım alanı dışında kalan kenarlar, sayım alanı yüzeyinden 0,1 mm yüksektir. Sayım alanı üzerine hemositometrenin lameli konulunca, lamel ile sayım alanı yüzeyi arasında 0,1 mm'lik bir boşluk kalır. Böylece lam ve lamel arasında kalan her karenin hacmi hesaplanabilir:

$$\begin{aligned} \text{En büyük (1mm}^2\text{'lik) karenin hacmi} &= 1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3 \\ 0,1 \text{ mm}^3 &= 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml'dir.} \end{aligned}$$

Deney gruplarımızda hemositometre lamının orta kısmında bulunan, 25 orta büyüklükte kareye ayrılmış ve her bir orta karenin de 16 küçük kareye bölündüğü  $1 \text{ mm}^2$ 'lik büyük karenin tamamı sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi. Mililitredeki toplam hemosit sayısının hesaplanması için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

$$\text{Hücre sayısı / ml} = \text{Büyük karede sayılan hücre sayısı} \times \text{Sulandırma katsayısı} \times 10^4$$



Şekil 2.2. Neubauer hemositometresi sayım alanı

## 2.6 *P. turionellae* zehiri ve parazitlemesinin konak farklı hemosit sayılarına etkileri

Zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin *G. mellonella* pup ve larvasında farklı hemosit sayılarına etkilerinin belirlenebilmesi için yukarıda anlatıldığı şekilde (Bölüm 2.5) deney grupları oluşturuldu. Son evre *G. mellonella* larvalarına 0,5 KEZ, 0,1 KEZ, 0,05 KEZ ve 0,02 KEZ enjeksiyonu, 1-2 günlük *G. mellonella* puplarına 0,05 KEZ, 0,02 KEZ, 0,01 KEZ ve 0,005 KEZ enjeksiyonu ve parazitlemeden 4, 8 ve 24 saat sonra hemolenf örnekleri mikrokapiler tüp yardımıyla alınarak melanizasyona izin vermeden hızlı bir şekilde daha önce alkolle temizlenmiş lamlar üzerine yayıldı. Kontrol grubu olarak kullanılan ve hiçbir işleme tabi tutulmamış normal larva ve puplar ile boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış larva ve puplardan da aynı şekilde hemolenf örnekleri alınıp lam üzerine yayılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Lamaların kurumasını takiben hemositlerin

fiksasyonu için lamalar 5 dakika süre ile metanol içinde bekletildi ve metanol üzerlerinden akıtılarak kurumaya bırakıldı.

Tespit işleminden sonra kurutulan lamalar giemsa boya çözeltisi içine alınarak pup hemolenfi preparatlarında 15 dakika, larva hemolenfi preparatlarında 10 dakika bekletildi ve boyanmaları sağlandı. Boyanma süresi sonunda lamalar saf su ile yıkandı, en son PBS'den geçirildi ve kurumaya bırakıldı. Farklı hemosit sayılarının belirlenebilmesi için preparatlar entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda X1000 defa büyütülerek incelendi. Pupal evrede her kese eşdeğeri zehir dozu, parazitleme ve kontrol grupları için ve larval evrede kese eşdeğeri zehir dozları ve kontrol grupları için hazırlanan preparatlarda 1000 hücre sayılarak farklı hemosit tiplerinin sayıları belirlendi ve deneyler dört kez tekrar edildi.

## **2.7 *P. turionellae* zehiri ve parazitlemesinin konak hemositlerinde apoptotik indekse etkileri**

Hücre apoptozuna özgü özelliklerin belirlenebilmesi için floresans mikroskobu yaygın olarak kullanılmaktadır. Deneylerde apoptotik indeksi belirlemek amacıyla hücre DNA'sını boyayan Acridine Orange (AO) ve sadece membran bütünlüğü bozulmuş geç apoptotik veya nekrotik hücreleri boyayan Ethidium Bromide (EB) boyaları kullanıldı. Acridine orange'ın canlı ve ölü hücrelerin içerisine girip çift zincirli DNA'ya bağlanması sonucu yeşil floresans, tek zincirli RNA'ya bağlanması ve lizozomlarda birikmesi sonucu kırmızı veya turuncu floresans yayılmaktadır [230]. Ethidium bromide ise membran bütünlüğü bozulmuş hücrelere girerek DNA'ya bağlanıp kırmızı floresans yaymaktadır (apoptozisin geç evresi ve nekroz). Bu çift boyama kullanılarak dört hücre grubu tespit edilebilmektedir;

- Canlı hücreler (Nükleus yeşil, sitoplazma turuncu veya kırmızı görünebilir).
- Erken apoptozis (Hücre membran bütünlüğü bozulmamıştır ancak kromatin yoğunlaşması ve fragmantasyonu vardır, nükleus parlak yeşil görünür).

- Geç apoptozis (Sekonder nekroz veya apoptotik nekroz da denmektedir. Ethidium Bromide membran bütünlüğü bozulmuş hücelere girerek nükleusu turuncu renge boyamaktadır. Kromatin yoğunlaşması ve fragmantasyonu vardır).
- Nekroz (Şekil olarak normal olan turuncu nükleus gözlenir) [230, 231].

AO ve EB genel olarak apoptozisin belirlenmesinde kullanılan floresans boyalar olmasına rağmen böcek hemositlerinde apoptotik indekste bu yöntemin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle çalışmaların ilk etabında boyaların *G. mellonella* hemositleri için uygun olabilecek farklı derişimleri denendi ve PBS içinde hazırlanan 100 µg/ml AO ve 100 µg/ml EB özeltisi karışımının hemositler için uygun olduğuna karar verildi.

*P. turionellae* zehir enjeksiyonu ve parazitlemesinin konak larva ve pup hemositlerinde erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücre sayılarına etkilerinin belirlendiği çalışmalarda pup için 0,05, 0,02, 0,01 ve 0,005 KEZ dozları, larva için ise 0,5, 0,1, 0,05 ve 0,02 KEZ dozları hazırlanarak bekletilmeden *G. mellonella* larva ve puplarına enjekte edildi. Hemolenf kaybını engellemek için enjeksiyon bölgesi vazelin ile kapatıldı. Parazitlemenin apoptotik indekse etkilerinin belirlendiği çalışmalarda 1-2 günlük *G. mellonella* pupları *P. turionellae* dişilerine sunuldu. Kontrol gruplarında boş enjeksiyon yapılmış, 5 µl PBS enjekte edilmiş ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış normal pup ve larvalar kullanılmak üzere üç ayrı kontrol serisi oluşturuldu. Zehir enjeksiyonu ve parazitlemeyi takiben 4, 8 ve 24 saat sonra hemolenf örnekleri alınıp erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücrelerin sayıları belirlendi. Bunun için *G. mellonella* larva ve pup hemolenfi lam üzerine yayıldı ve sırasıyla 100 µg/ml AO ve 100 µg/ml EB çözeltilerinden 5 µl ilave edilerek bekletilmeden Olympus BX51 marka floresans mikroskobunda mavi ışıpta incelendi. Her KEZ dozu ve zaman için hazırlanan preparatlarda 500 hücre sayıldı ve bütün deneyler üç kez tekrar edildi. Elde edilen sonuçlar yüzde (%) olarak değerlendirildi.



## **2.8 *P. turionellae* zehiri ve parazitlemesinin konak hemositlerinde mitotik indekse etkileri**

*P. turionellae* farklı kese eşdeğeri zehir dozlarının ve parazitlemesinin konak *G. mellonella* hemositlerinde mitotik indekse etkilerinin belirlendiği çalışmalarda pup için 0,05, 0,02, 0,01 ve 0,005 KEZ, larva için ise 0,5, 0,1, 0,05 ve 0,02 KEZ dozları hazırlanarak bekletilmeden *G. mellonella* larva ve puplarına enjekte edildi. Hemolenf kaybını engellemek için enjeksiyon bölgesi vazelin ile kapatıldı. Parazitlemenin mitotik indekse etkilerinin belirlendiği çalışmalarda 1-2 günlük *G. mellonella* pupları *P. turionellae* dişilerine sunuldu. Kontrol gruplarında boş enjeksiyon yapılmış, 5 µl PBS enjekte edilmiş ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış normal pup ve larvalar kullanılmak üzere üç ayrı kontrol serisi oluşturuldu.

Zehir enjeksiyonu ve parazitlemeyi takiben 4, 8 ve 24 saat sonra hemolenf örnekleri alınıp mitotik evredeki hücrelerin sayıları belirlendi. Bunun için *G. mellonella* larva ve pup hemolenfi lam üzerine yayıldı ve sırasıyla 100 µg/ml AO ve 100 µg/ml EB çözeltilerinden 5 µl ilave edilerek bekletilmeden Olympus BX51 marka floresans mikroskopunda mavi ışıkta incelendi. Her KEZ dozu ve zaman için hazırlanan preperatlarda 500 hücre sayıldı ve bütün deneyler üç kez tekrar edildi. Elde edilen sonuçlar yüzde (%) olarak değerlendirildi.

## **2.9 *P. turionellae* zehiri ve parazitlemesinin konak hemositlerinde in vivo enkapsülasyon ve melanizasyona etkileri**

*P. turionellae* zehir enjeksiyonu ve parazitlemesinin konak larva ve pup hemositlerinin enkapsülasyon ve melanizasyon davranışlarına etkilerinin belirlendiği çalışmalarda enkapsülasyon hedefi olarak Sephadex DEAE A-25 (40-120 µm çapında) kromatografi boncukları kullanıldı. Boncukların böcek içerisinde bulunmasını kolaylaştırmak amacıyla öncelikle boncuklar ependorf santrifüj tüpüne alındı ve üzerlerine PBS içinde hazırlanan %1'lik Coomassie mavisi çözeltisi (Brilliant Blue G Sigma) mikropipet yardımıyla ilave edildi [39]. Sephadex A-25 boncukları bu boya çözeltisi içerisinde 1 saat bekletilerek boyanmaları sağlandı. Bir

saatin sonunda supernatant uzaklaştırıldı ve boncuklar üzerine taze PBS eklenerek boncukların yıkanması sağlandı. Yıkama işlemi üç kez tekrar edildi [39].

Deney gruplarının oluşturulmasında Bölüm 2.5’de bahsedildiği şekilde *P. turionellae* farklı KEZ dozları hazırlandı ve kontrol grubu olarak hiçbir işleme tabi tutulmamış son evre larva ve 1-2 günlük *G. mellonella* pupları, boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış larva ve puplar kullanıldı. Enjeksiyon bölgesi hemolenf kaybını engellemek için vazelin ile kapatıldı. Enjeksiyon ve parazitlenme işleminden 1 saat sonra, daha önce hazırlanan ve içerisinde 15 – 20 adet Sephadex A-25 boncuğu bulunan stok boncuk çözeltisinden 10 µl PBS Hamilton marka mikroenjektör (50 µl’lik ve 22 g enjektör uçlu) yardımıyla çekilerek konak larva ve puplarına enjekte edildi. Deney grupları oluşturulurken her zehir dozu, parazitlenme ve kontrol grupları için beşer pup ve larva kullanıldı. Enjeksiyon yapılmış ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış 15’er pup ve larva beşerli gruplara ayrılarak kültür odasına alındı. Parazitlenmeyi ve zehir enjeksiyonunu takiben 4 ve 24 saat sonra stereomikroskop altında 40’lık büyütmede pup ve larvalar disekte edildi. Larva ve pupların tüm vücut bölgeleri incelenerek bulunan boncuklar ince uçlu diseksiyon iğnesi yardımıyla alınıp üzerinde bir damla PBS bulunan lam üzerine aktarıldı, lamel ile kapatılarak mikroskopta incelendi ve hemositlerin enkapsülasyon davranışları belirlendi. Böcek içerisinden çıkarılan boncuklar;

- boncuk enkapsüle olmamış veya üzerinde birkaç hemosit var ise enkapsüle olmamış,
- boncuk üzerinde 2-10 katman hemosit var ise zayıf enkapsüle olmuş,
- boncuk üzerinde 10 ve daha fazla hemosit katmanı var ise güçlü enkapsüle olmuş

olarak üç farklı şekilde ele alındı [232].

Ayrıca böcek içerisinden alınan ve enkapsüle olmuş boncuklar melanize olup olmamalarına göre de değerlendirildi ve melanizasyon yüzdeleri hesaplandı. Bütün KEZ dozları, parazitlenme ve kontrol gruplarını içeren deneyler üç kez tekrar edildi.

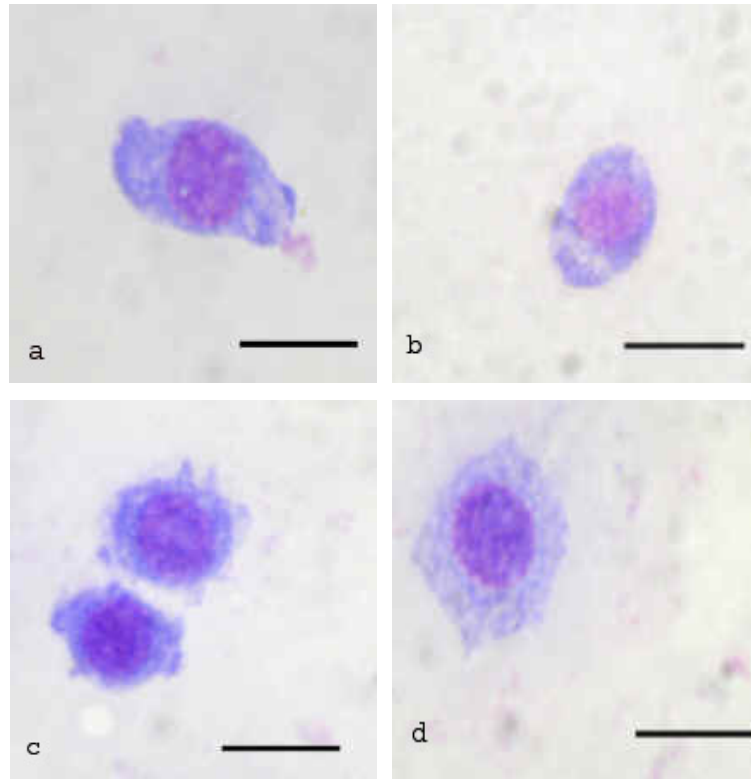
## 2.10 İstatistik

Bütün deney sonuçlarından elde edilen ortalamalar bir, iki ve/veya üç yönlü varyans analizleri (ANOVA) ile karşılaştırıldı. Ortalamalar arası farklar Tukey gerçekten anlamlı farklılık (Tukey HSD) testleri ile belirlendi. Veri analizinde SPSS istatistik programı [233] kullanıldı. Yüzde olarak verilen tüm değerler analizlerden önce arcsinüs karekökleri alınarak normalleştirildi ve istatistiksel analizlere tabii tutuldu. Ancak, sonuçlar yüzde olarak sunuldu. Sonuçlar  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

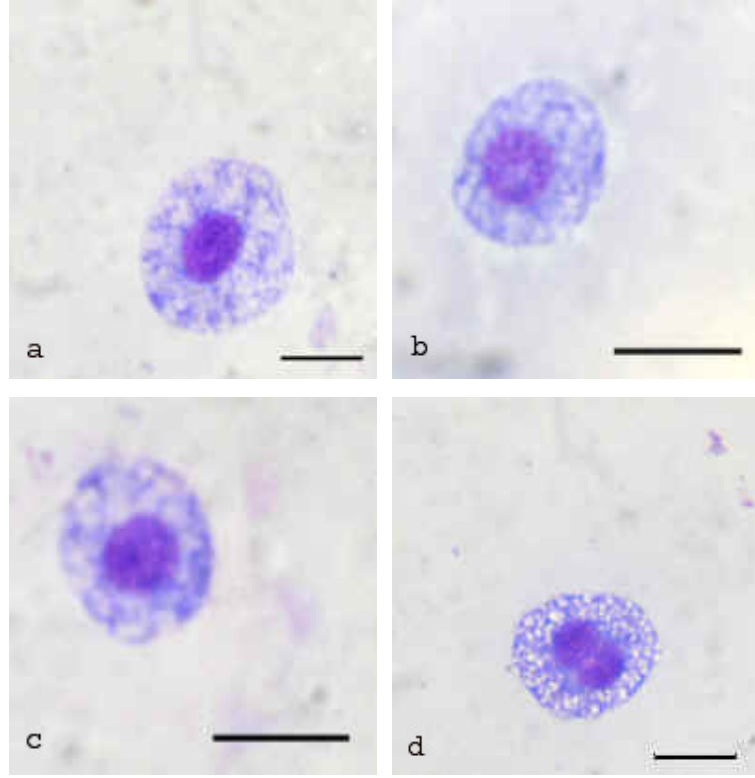
### 3. BULGULAR

#### 3.1 *G. mellonella*' da hemosit tipleri

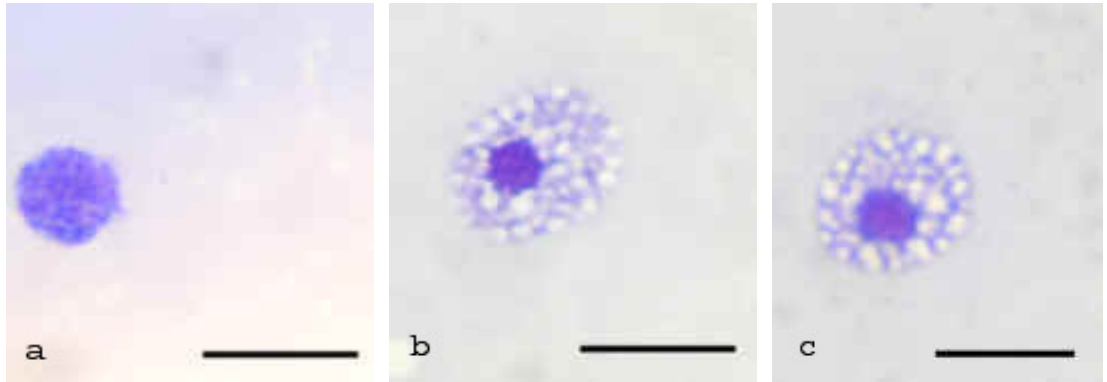
*G. mellonella*'da farklı tipteki hemositler Giemsa ile boyandıklarında çekirdekleri açık-koyu pembe, sitoplazmaları ise açık-koyu lacivert olarak boyandı. Mikroskopik inceleme sonucunda *G. mellonella* larva hemolenfinde mevcut olan hemosit tipleri plazmatositler (Şekil 3.1), granülositler (Şekil 3.2), sferülositler (Şekil 3.3), prohemositler (Şekil 3.3) ve önositoidler (Şekil 3.4) olarak belirlendi. Pup hemolenfinde ise plazmatositler (Şekil 3.5), granülositler (Şekil 3.6) prohemositler (Şekil 3.7) ve sferülositler (Şekil 3.7) temel hemosit tipleri olarak belirlendi ancak incelenen hiçbir pup preparatında önositoidlere rastlanmadı.



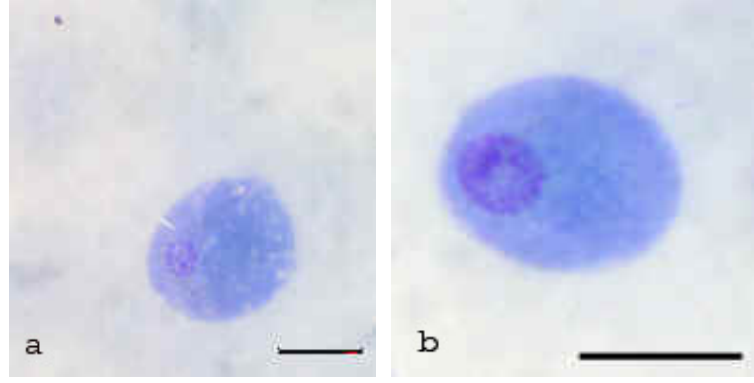
**Şekil 3.1.** *G. mellonella* son evre larvasında plazmatositler. Ölçü çubuğu: 10 µm.



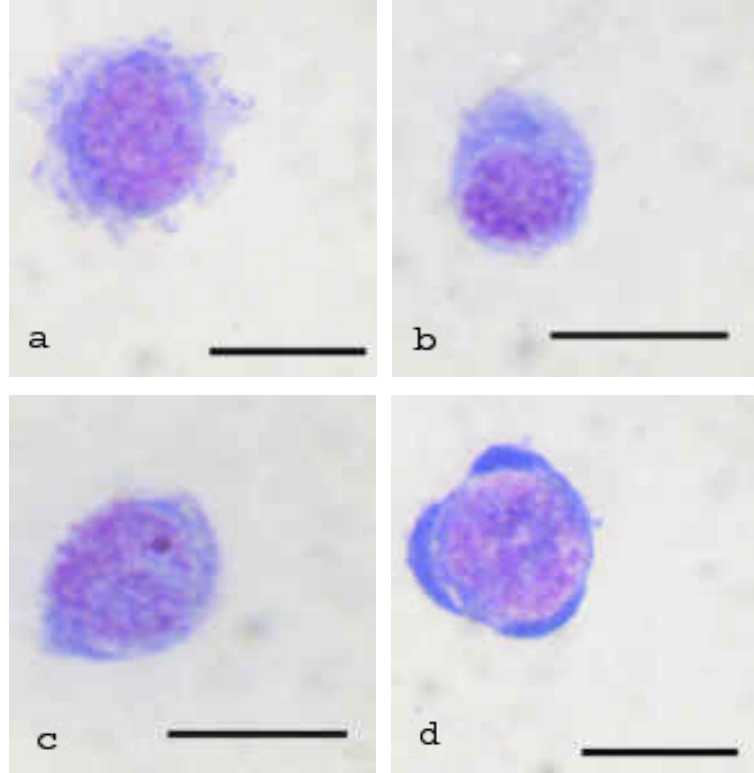
**Şekil 3.2.** *G. mellonella* son evre larvasında granüositler. Ölçü barı: 10  $\mu$ m.



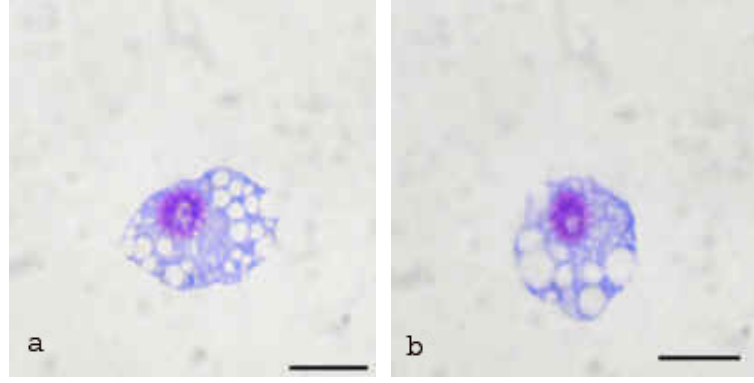
**Şekil 3.3.** *G. mellonella* son evre larvasında Prohemosit (a); Sferüositler (b), (c). Ölçü Barı: 10  $\mu$ m.



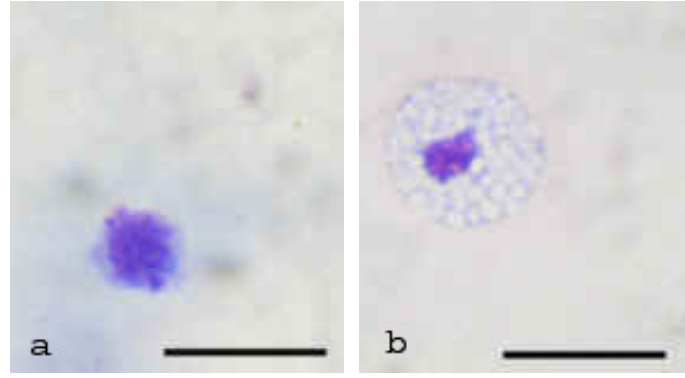
**Şekil 3.4.** *G. mellonella* son evre larvasında önositoidler. Ölçü barı: 10  $\mu$ m.



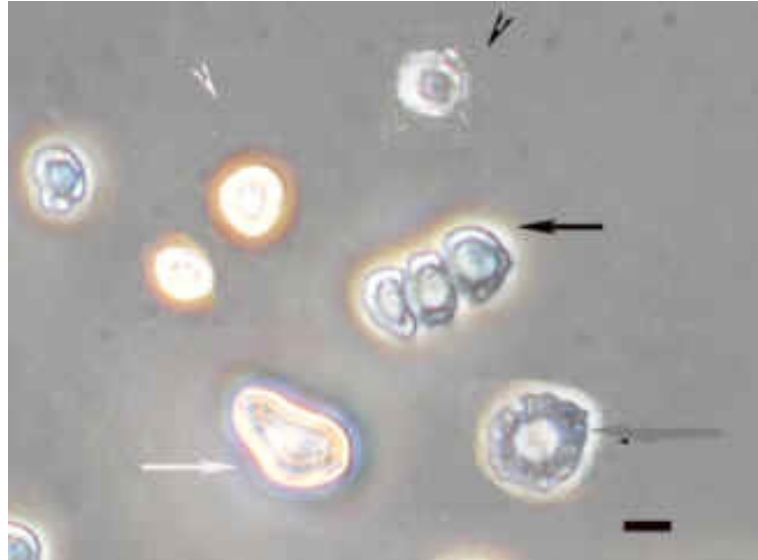
**Şekil 3.5.** *G. mellonella* pup evresinde plazmatositler. Ölçü barı: 10  $\mu$ m.



**Şekil 3.6.** *G. mellonella* pup evresinde granüositler. Ölçü barı: 10 µm.



**Şekil 3.7.** *G. mellonella* pup evresinde Prohemosit (a), Sferüosit (b). Ölçü barı: 10 µm.



**Şekil 3.8.** *G. mellonella* larvasında granüosit (gri ok), plazmatositler (siyah ok), önositoid (beyaz ok), sferüositler (beyaz ok ucu), prohemosit (siyah ok ucu). Faz-kontrast fotoğrafı, Ölçü Barı = 10 µm.

### **3.2 *P. turionellae* zehir enjeksiyonu ve parazitlenmesinin konak *G. mellonella* pupu toplam hemosit sayılarına etkileri**

*P. turionellae* farklı kese eşdeğeri zehir dozlarının ve parazitlenmesinin konak *G. mellonella* pupu toplam hemosit sayılarına etkileri üç tekrarlı deney serileri ile belirlendi. Tablo 3.1’de görüldüğü gibi hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupunda 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda hemosit sayıları sırası ile 10,60, 12,00 ve 10,14 x 10<sup>6</sup> hücre/ml olarak belirlendi (Tablo 3.1). Deneyleri müteakip, 4 (F=6,614; sd=7, 112; P=0,000), 8 (F=19,972; sd=7, 112; P=0,000) ve 24 (F=11,864; sd=7, 112; P=0,000) saatin sonunda *G. mellonella* pupunun hemosit sayısı deney ve kontrol grupları arasında önemli farklılık gösterdi (Tablo 3.1). Parazitlenme ve deneysel olarak *P. turionellae* zehirine maruz kalan *G. mellonella* pupunda dolaşımdaki toplam hemosit sayıları hiçbir işleme tabi tutulmamış puplara göre önemli derecede azaldı (Tablo 3.1, Şekil 3.9). Zehir enjekte edilmiş ve parazitlenmiş gruplarda mililitredeki toplam hemosit sayısı tüm zaman dönemlerinde normal puplara göre % 50’den fazla azalma gösterdi (Tablo 3.1). Toplam hemosit sayısı en yüksek doz olan 0,05 KEZ enjeksiyonunda 4 saatlik periyotta 4,02 x 10<sup>6</sup> hücre/ml bulunurken, 8 saatlik periyotta 2,85 x 10<sup>6</sup> hücre/ml’ye, 24 saat sonra ise elde edilen en düşük değer olan 2,48 x 10<sup>6</sup> hücre/ml’ye düştü (Tablo 3.1). Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda toplam hemosit sayıları hiçbir işleme tabi tutulmamış normal puplardan daha çok zehir enjeksiyonu yapılmış ve parazitlenmiş gruplara benzerlik gösterdi (Tablo 3.1, Şekil 3.9). Enjeksiyon yapılmış tüm gruplarda özellikle 4 ve 8 saatlik periyotlarda toplam hemosit sayılarında normal puplara göre istatistiksel olarak anlamı azalmalar oldu. Bununla beraber mililitredeki toplam hemosit sayısı boş enjeksiyon yapılmış puplarda 8 saatlik (7,98 x 10<sup>6</sup> hücre/ml) ve 24 saatlik periyotlarda (7,17 x 10<sup>6</sup> hücre/ml) ve PBS enjekte edilmiş puplarda 24 saatlik periyotta (6,73 x 10<sup>6</sup> hücre/ml) zehir enjekte edilmiş ve parazitlenmiş gruplara göre yüksek bulundu. PBS enjekte edilmiş gruplarda enjeksiyonu takiben 24 saat sonra toplam hemosit sayısında meydana gelen artış 4 ve 24 saatlik gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Çift yönlü ANOVA sonuçlarına göre konak pupal hemosit sayılarına zehir enjeksiyonu ve parazitlenmenin etkisi deney gruplarına bağlı (P=0,000) ancak zamana bağlı değildi (P=0,517). Deney ve kontrol grupları ile hemosit sayısı arasındaki etkileşim zamandan etkilenmedi (P=0,109) (Tablo 3.2).

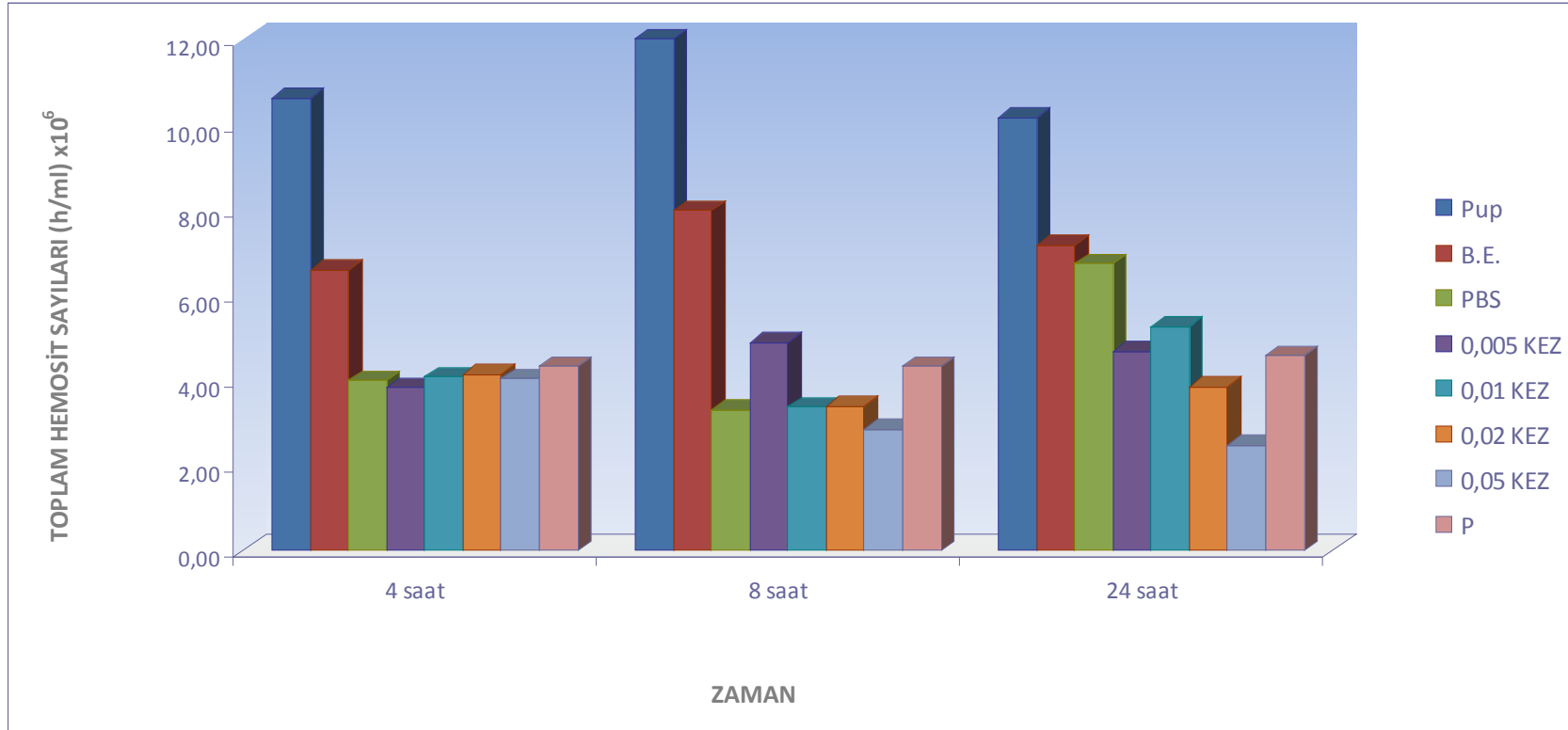


**Tablo 3.1.** Zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin *G. mellonella* pupu toplam hemosit sayılarına ( $\times 10^6$  hücre/ml) etkileri.

Deney Grupları	Toplam Hemosit Sayıları ( $\times 10^6$ hücre /ml) (Ortalama $\pm$ SH) <sup>#</sup>			İstatistik (ANOVA)		
	Deneyi müteakip gözlem zamanı (saat) <sup>*</sup>			F	df	P
	4	8	24			
Normal Pup	10,60 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup> x	12,00 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup> x	10,14 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup> x	0,601	2, 42	0,553
Boş Enjeksiyon	6,57 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup> x	7,98 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup> x	7,17 $\pm$ 0,9 <sup>ab</sup> x	0,395	2, 42	0,676
PBS Enjeksiyon	3,99 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup> x	3,29 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup> x	6,73 $\pm$ 0,5 <sup>bc</sup> y	11,829	2, 42	0,000
0,005 KEZ	3,82 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup> x	4,87 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup> x	4,67 $\pm$ 0,6 <sup>bcd</sup> x	0,996	2, 42	0,378
0,01 KEZ	4,07 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup> x	3,37 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup> x	5,26 $\pm$ 0,7 <sup>bcd</sup> x	2,243	2, 42	0,119
0,02 KEZ	4,12 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup> x	3,39 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup> x	3,83 $\pm$ 0,5 <sup>cd</sup> x	0,451	2, 42	0,640
0,05 KEZ	4,02 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup> x	2,85 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup> x	2,48 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup> x	1,805	2, 42	0,177
Parazitleme	4,32 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup> x	4,32 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup> x	4,57 $\pm$ 0,6 <sup>bcd</sup> x	0,058	2, 42	0,944

<sup>#</sup> Her biri 15 pupun toplam hemosit sayısı ortalamalarını göstermektedir.

<sup>\*</sup> Aynı sütunda (a-d) ve satırda (x-y) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).



**Şekil 3.9.** KEZ dozlarının ve parazitlemenin farklı zaman dönemlerinde konak pupu toplam hemosit sayılarına etkileri. Pup: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış 1-2 günlük *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitlenme.

**Tablo 3.2.** Farklı deney grupları, zaman ve etkileşimlerinin *G. mellonella* pupu toplam hemosit sayılarına etkilerini gösteren ANOVA tablosu.

Evre	Kaynak	sd	KO	F	P	r <sup>2</sup>
Pup	Deney Grupları	7	291,833	32,052	0,000	0,42
	Zaman	2	6,020	0,661	0,517	
	Deney Grupları x Zaman	14	13,657	1,500	0,109	
	Hata	336	9,105			

### **3.3 *P. turionellae* zehir enjeksiyonunun konak *G. mellonella* larvası toplam hemosit sayılarına etkileri**

*P. turionellae* farklı kese eşdeğeri zehir dozlarının konak son evre larvasında toplam hemosit sayılarına etkileri üç tekrarlı deney serileri ile belirlendi. Hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvasında 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda hemosit sayıları sırası ile 15,77, 17,51 ve 17,49 x10<sup>6</sup> hücre/ml olarak sayıldı (Tablo 3.3). Deneyleri müteakip 4 (F=4,967; sd=6, 98; P=0,000), 8 (F=6,283; sd=6, 98; P=0,000) ve 24 (F=13,726; sd=6, 98; P=0,000) saat sonunda larval hemosit sayıları deney ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık gösterdi (Tablo 3.3, Şekil 3.10). Toplam hemosit sayıları boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda hiçbir işleme tabi tutulmamış son evre larvalara göre farklılık göstermedi. Aynı şekilde düşük zehir dozlarında (0,02 ve 0,05 KEZ) toplam hemosit sayılarında kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık belirlenmedi. *G. mellonella* larvalarına 0,1 KEZ dozu enjeksiyonunu takiben 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda dolaşımdaki toplam hemosit sayıları sırası ile 12,16, 14,77 ve 10,24 x10<sup>6</sup> hücre/ml olarak tespit edildi. 0,1 KEZ dozu enjeksiyonunu müteakip 4 saatlik periyotta toplam hemosit sayısında meydana gelen azalma hiçbir işleme tabi tutulmamış, boş enjeksiyon yapılmış ve PBS enjekte edilmiş gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, bu azalma düşük zehir dozlarına kıyasla anlamlı değildi. Ancak 24 saat sonra mililitredeki toplam hemosit sayısında hem daha düşük zehir dozları hem de kontrol gruplarına göre önemli bir azalma görüldü. En düşük hemosit sayıları 9,61 x 10<sup>6</sup> ve 6,21 x 10<sup>6</sup>

hücre/ml en yüksek doz olan 0,5 KEZ değerinde enjeksiyonu takiben sırasıyla 8 ve 24 saat sonra belirlendi (Tablo 3.3). *G. mellonella* pupal hemosit sayılarının aksine larval hemositlere zehir enjeksiyonunun etkisi hem deney gruplarına (P=0,000) hem de zamana bağlıdır (P=0,000) ve deney ve kontrol grupları ile hemosit sayısı arasındaki etkileşim zamandan etkilenmektedir (P=0,021). (Tablo 3.4).

**Tablo 3.3.** Zehir enjeksiyonunun *G. mellonella* son evre larvası toplam hemosit sayılarına ( $\times 10^6$  hücre/ml) etkileri.

Deney Grupları	Toplam Hemosit Sayıları ( $\times 10^6$ hücre /ml) (Ortalama $\pm$ SH) <sup>#</sup>			İstatistik (ANOVA)		
	Deneyi müteakip gözlem zamanı (saat) <sup>*</sup>			F	df	P
	4	8	24			
Normal Larva	15,77 $\pm$ 1,8 <sup>ab x</sup>	17,51 $\pm$ 1,6 <sup>a x</sup>	17,49 $\pm$ 1,1 <sup>a x</sup>	0,444	2, 42	0,644
Boş Enjeksiyon	21,87 $\pm$ 3,0 <sup>a x</sup>	19,79 $\pm$ 1,2 <sup>a x</sup>	15,31 $\pm$ 1,1 <sup>a x</sup>	2,992	2, 42	0,061
PBS Enjeksiyon	21,79 $\pm$ 1,3 <sup>a x</sup>	15,83 $\pm$ 1,8 <sup>a y</sup>	16,04 $\pm$ 1,6 <sup>a y</sup>	4,653	2, 42	0,015
0,02 KEZ	18,27 $\pm$ 0,9 <sup>ab x</sup>	18,19 $\pm$ 0,9 <sup>a x</sup>	18,57 $\pm$ 1,1 <sup>a x</sup>	0,045	2, 42	0,957
0,05 KEZ	18,73 $\pm$ 1,7 <sup>ab x</sup>	18,28 $\pm$ 1,4 <sup>a x</sup>	14,67 $\pm$ 1,6 <sup>ab x</sup>	2,046	2, 42	0,142
0,1 KEZ	12,16 $\pm$ 0,9 <sup>b xy</sup>	14,77 $\pm$ 1,3 <sup>ab x</sup>	10,24 $\pm$ 0,9 <sup>bc y</sup>	4,717	2, 42	0,014
0,5 KEZ	12,99 $\pm$ 1,9 <sup>b x</sup>	9,61 $\pm$ 1,1 <sup>b xy</sup>	6,21 $\pm$ 0,6 <sup>c y</sup>	6,627	2, 42	0,003

<sup>#</sup> Her biri 15 son evre larvanın toplam hemosit sayısı ortalamalarını göstermektedir.

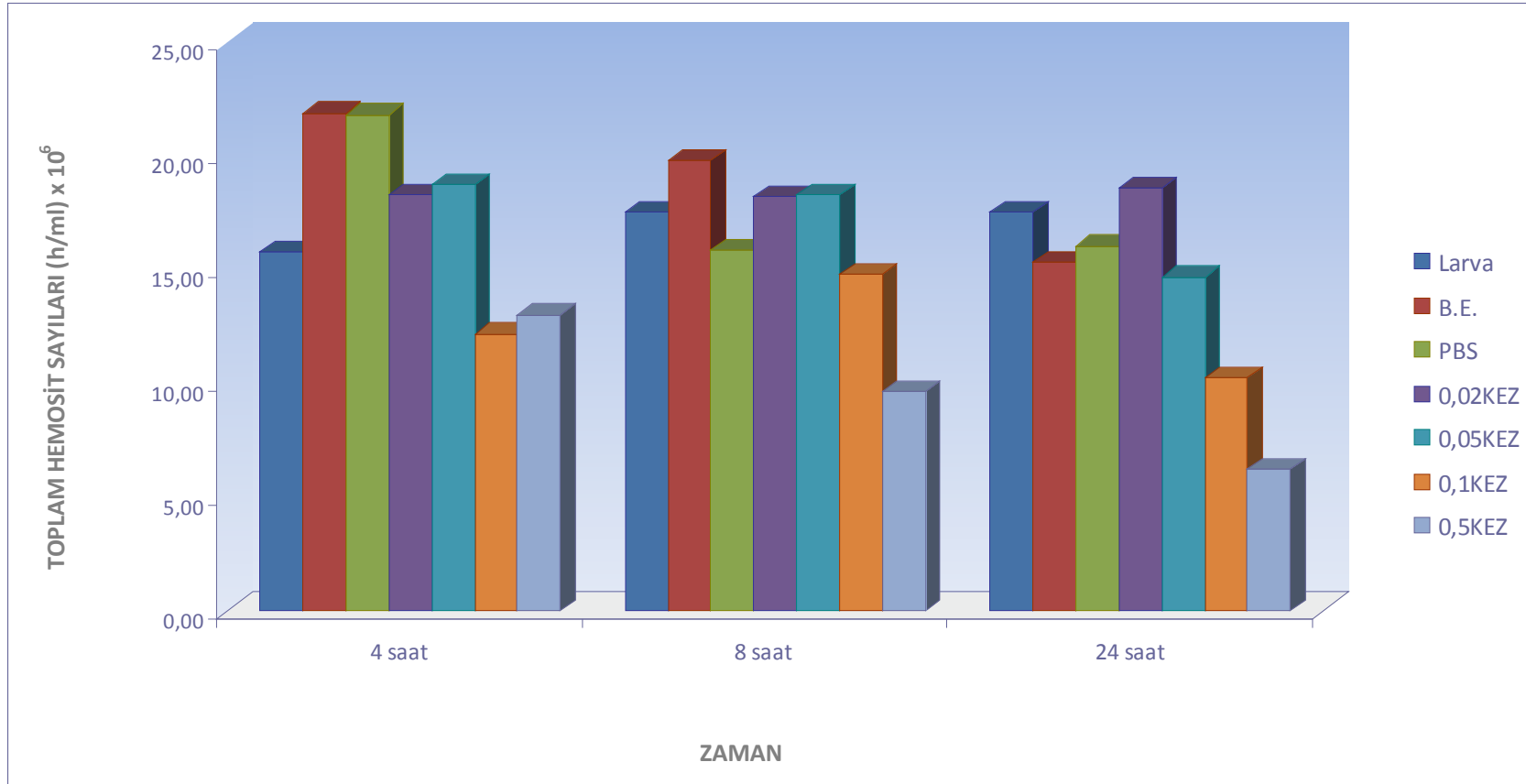
<sup>\*</sup> Aynı sütunda (a-c) ve satırda (x-y) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

**Tablo 3.4.** Farklı deney grupları (kontrol ve zehir enjekte edilmiş), zaman ve etkileşimlerinin *G. mellonella* son evre larvası toplam hemosit sayılarına etkilerini gösteren ANOVA tablosu.

Evre	Kaynak	sd	KO	F	P	r <sup>2</sup>
	Deney Grupları	6	556,958	17,767	0,000	
	Zaman	2	295,982	9,442	0,000	
Larva	Deney Grupları x Zaman	12	64,121	2,045	0,021	0,42
	Hata	294	31,347			

### 3.4 *P. turionellae* zehiri ve parazitlenmesinin konak *G. mellonella* pupu farklı hemosit sayılarına etkileri

*P. turionellae* farklı kese eşdeğeri zehir dozlarının ve parazitlenmesinin konak *G. mellonella* pupu farklı hemosit sayılarına etkileri dört tekrarlı deney serileri ile belirlendi. *G. mellonella* pupal hemosit tipleri morfolojik olarak granülositler, plazmatositler, prohemositler ve sferülositler olarak sınıflandırıldı. Zehir enjeksiyonu ve parazitlenmenin konak farklı hemosit tiplerine etkilerinin belirlendiği çalışmalarda tüm hemosit tipleri ayrı olarak sayıldı ancak verilerin değerlendirilmesinde granülositler, plazmatositler ve diğer hücre tipleri olarak isimlendirildi. Tablo 3.5 ve 3.6'da görüldüğü gibi hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupunda en yoğun bulunan hücre tipi granülositler ve onu takiben ikinci yoğun hücre tipi plazmatositler olarak belirlendi. Kontrol grubunu oluşturan normal puplarda 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda granülositler sırasıyla % 560,75 ± 31,8, 586,00 ± 9,8 ve 576,0 ± 9,9, plazmatositler ise % 428,0 ± 30,3, 404,0 ± 9,8 ve 413,0 ± 8,4 oranında bulundu (Tablo 3.5 ve Tablo 3.6). En yüksek zehir dozları olan 0,02 ve 0,05 KEZ dozları ve parazitlenmeyi takiben 4. saatte granülositlerin sayısı kontrol grupları ve daha düşük zehir dozlarına (0,005 ve 0,01 KEZ) göre azaldı (Tablo 3.5, Şekil 3.11).



**Şekil 3.10.** KEZ dozlarının farklı zaman dönemlerinde konak larvası toplam hemosit sayılarına etkileri, Larva: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.

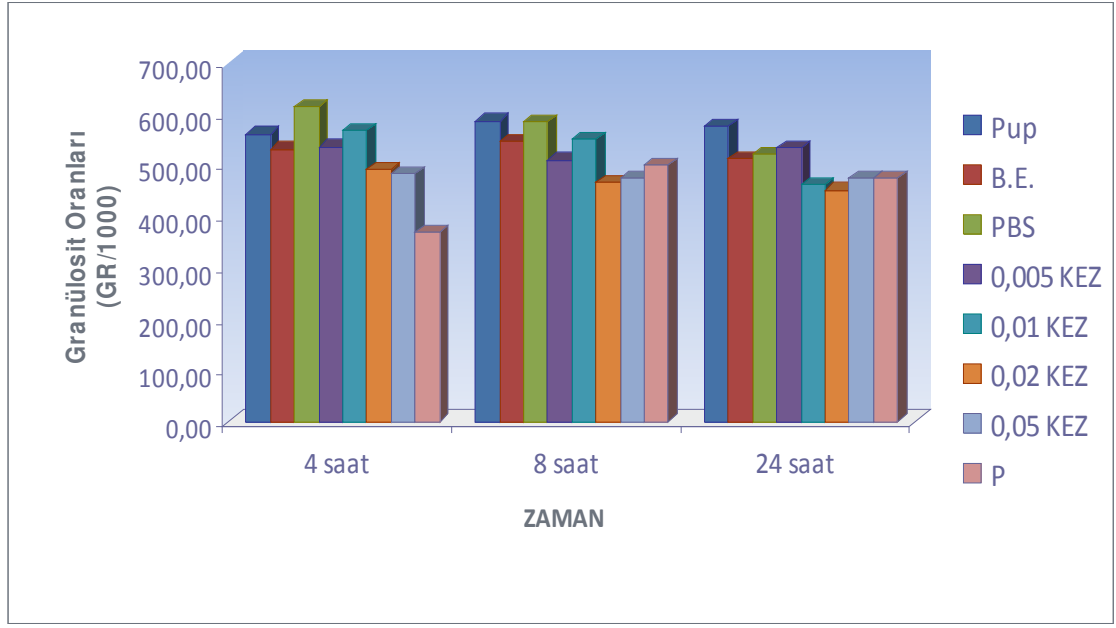
**Tablo 3.5.** Zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin *G. mellonella* pupunda granülosit sayılarına (Granülosit/1000) etkileri.

Hemosit tipi	Deney Grupları	Granülosit Sayıları			İstatistik		
		(hücre / 1000) (Ort. ± SH) #			(ANOVA)		
		Deneyi müteakip gözlem zamanı (saat)*			F	df	P
		4	8	24			
GR	Normal Pup	560,75 ± 31,8 <sup>a x</sup>	586,00 ± 9,8 <sup>a x</sup>	576,00 ± 9,9 <sup>a x</sup>	0,403	2, 9	0,680
	Boş Enjeksiyon	531,25 ± 18,4 <sup>a x</sup>	545,25 ± 21,1 <sup>a x</sup>	513,25 ± 17,1 <sup>a x</sup>	0,715	2, 9	0,515
	PBS Enjeksiyon	613,75 ± 26,6 <sup>a x</sup>	583,25 ± 59,2 <sup>a x</sup>	520,00 ± 29,0 <sup>a x</sup>	1,360	2, 9	0,305
	0,005 KEZ	535,25 ± 13,4 <sup>a x</sup>	509,75 ± 5,4 <sup>a x</sup>	532,75 ± 15,0 <sup>a x</sup>	1,362	2, 9	0,304
	0,01 KEZ	566,25 ± 16,0 <sup>a x</sup>	551,25 ± 10,8 <sup>a xy</sup>	461,25 ± 41,2 <sup>a y</sup>	4,668	2, 9	0,041
	0,02 KEZ	492,50 ± 8,3 <sup>ab x</sup>	464,25 ± 23,7 <sup>a x</sup>	451,50 ± 38,5 <sup>a x</sup>	0,632	2, 9	0,554
	0,05 KEZ	483,25 ± 33,5 <sup>ab x</sup>	474,50 ± 22,8 <sup>a x</sup>	475,00 ± 36,7 <sup>a x</sup>	0,024	2, 9	0,976
	Parazitlenme	370,25 ± 74,8 <sup>b x</sup>	499,00 ± 17,5 <sup>a x</sup>	475,25 ± 30,6 <sup>a x</sup>	2,059	2, 9	0,184

# Her biri 1-2 günlük 4 pupun granülosit sayısı ortalamalarını göstermektedir.

\* Aynı sütunda (a-b) ve satırda (x-y) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05). GR: Granülosit.

Yüksek zehir dozları (0,02 and 0,05 KEZ) enjekte edilmiş *G. mellonella* pupunda ilk 4 saatlik periyotta granülositlerin sayılan tüm hücrelere oranı % 50'den az, parazitlenmiş gruplarda % 37, hiçbir işleme tabi tutulmamış puplarda ise % 56 olarak bulundu. Tablo 3.5'de görüldüğü gibi parazitlemeyi takiben ilk 4 saatlik periyotta granülosit sayısında görülen azalma istatistiksel olarak önemliydi. Ancak granülosit sayılarındaki farklılıklar 8 (F=3,157; sd=7, 24; P=0,058) ve 24. (F=2,065; sd=7, 24;



**Şekil 3.11.** KEZ dozlarının ve parazitlemenin farklı zaman dönemlerinde konak pupu granülosit oranlarına etkileri, Pup: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış 1-2 günlük *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitleme.

P=0,088) saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 3.5). 0,02 ve 0,05 KEZ enjeksiyonunu ve parazitlemeyi takiben 4 saat sonunda kontrol grubu ve düşük zehir dozlarına göre plazmatositlerin sayısı arttı (Tablo 3.6, Şekil 3.12). Plazmatosit sayısı tüm deney ve kontrol grupları arasında en yüksek parazitlemeyi takiben 4 saat sonra  $\% 620,25 \pm 75,32$  olarak bulundu ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Plazmatosit sayılarında deney grupları arasında anlamlı değişiklikler 8'inci saatte de gözlemlendi (F=3,662; sd=7, 24; P=0,008) ancak 24'üncü saatte deney grupları arasında önemli bir farklılık görülmedi (F=2,044; sd=7, 24; P=0,091) (Tablo 3.6). 0,02 KEZ dozu enjeksiyonunu takiben 8 saat sonra plazmatosit sayısında meydana gelen artma hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol puplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 3.6). Diğer hemosit tipleri olarak tanımlanan prohemosit ve sferülosit sayılarında parazitleme, zehir dozları ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (4 s: F=0,250; sd=7, 24; P=0,967; 8 s: F=1,314; sd=7, 24; P=0,287; 24 s:F=0,718; sd=7, 24; P=0,658) (Tablo 3.7, Şekil 3.13).



Çift yönlü ANOVA sonuçlarına göre zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin konak pupu farklı hemosit sayılarına etkileri granülositler (deney grupları: P=0,000; zaman: P=0,212) ve plazmatositler (deney grupları: P=0,000; zaman: P=0,175) için deney gruplarına bağlı ancak zamana bağlı değildi ve her iki hemosit tipi için zehir dozları ve parazitlenme ile hemosit sayısı arasındaki ilişki zamandan etkilenmedi (P=0,115 ve P=0,106) (Tablo 3.8).

**Tablo 3.6.** Zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin *G. mellonella* pupunda plazmatosit sayılarına (Plazmatosit/1000) etkileri.

Hemosit tipi	Deney Grupları	Plazmatosit Sayıları (hücre / 1000) (Ort. ± SH) #			İstatistik (ANOVA)		
		Deneyi müteakip gözlem zamanı (saat)*			F	df	P
		4	8	24			
PL	Normal Pup	428,00 ± 30,3 <sup>a</sup> x	404,00 ± 9,8 <sup>ab</sup> x	413,00 ± 8,4 <sup>a</sup> x	0,406	2, 9	0,678
	Boş Enjeksiyon	457,00 ± 14,0 <sup>a</sup> x	444,00 ± 23,2 <sup>abc</sup> x	478,00 ± 16,8 <sup>a</sup> x	0,870	2, 9	0,451
	PBS Enjeksiyon	377,25 ± 27,6 <sup>a</sup> x	396,25 ± 52,7 <sup>a</sup> x	471,00 ± 27,5 <sup>a</sup> x	1,715	2, 9	0,234
	0,005 KEZ	454,75 ± 14,1 <sup>a</sup> x	480,75 ± 5,9 <sup>abc</sup> x	459,25 ± 15,5 <sup>a</sup> x	1,220	2, 9	0,340
	0,01 KEZ	422,25 ± 17,9 <sup>a</sup> x	440,25 ± 10,5 <sup>abc</sup> xy	529,00 ± 41,2 <sup>a</sup> y	4,611	2, 9	0,042
	0,02 KEZ	497,75 ± 10,0 <sup>ab</sup> x	527,25 ± 25,6 <sup>c</sup> x	537,75 ± 38,9 <sup>a</sup> x	0,569	2, 9	0,585
	0,05 KEZ	508,50 ± 35,2 <sup>ab</sup> x	517,00 ± 24,8 <sup>bc</sup> x	519,50 ± 36,5 <sup>a</sup> x	0,031	2, 9	0,969
	Parazitlenme	620,25 ± 75,32 <sup>b</sup> x	490,00 ± 21,11 <sup>abc</sup> x	513,75 ± 34,1 <sup>a</sup> x	1,983	2, 9	0,193

# Her biri 1-2 günlük 4 pupun plazmatosit sayısı ortalamalarını göstermektedir.

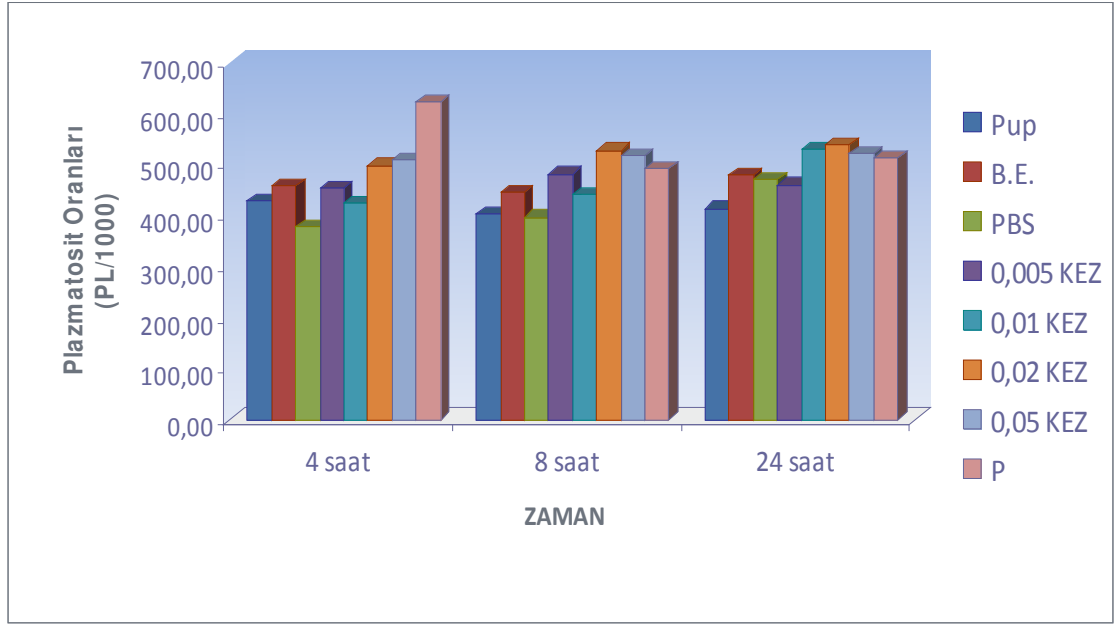
\* Aynı sütunda (a-c) ve satırda (x-y) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05). PL: Plazmatosit.

**Tablo 3.7.** Zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin *G.mellonella* pupunda diğ er hemosit tipleri sayılarına (DH/1000) etkileri.

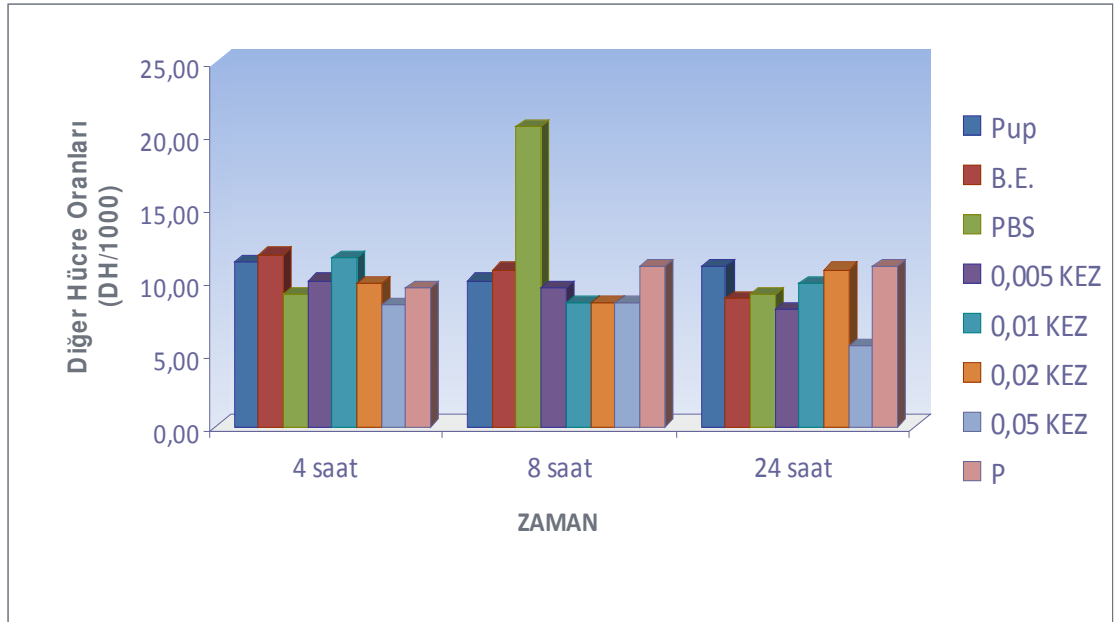
Hemosit tipi	Deney Grupları	Diğ er Hemosit Tipi Sayıları (hücre / 1000) (Ort. ± SH) #			İstatistik (ANOVA)		
		Deneyi müteakip gözlem zamanı (saat)*			F	df	P
		4	8	24			
DH	Normal Pup	11,25 ±	10,00 ±	11,00 ±	0,084	2, 9	0,920
		1,7 <sup>a</sup> x	2,2 <sup>a</sup> x	2,9 <sup>a</sup> x			
	Boş Enjeksiyon	11,75 ±	10,75 ±	8,75 ±	0,269	2, 9	0,770
		4,5 <sup>a</sup> x	2,4 <sup>a</sup> x	0,5 <sup>a</sup> x			
	PBS Enjeksiyon	9,00 ±	20,50 ±	9,00 ±	2,108	2, 9	0,178
		1,7 <sup>a</sup> x	7,3 <sup>a</sup> x	2,5 <sup>a</sup> x			
	0,005 KEZ	10,00 ±	9,50 ±	8,00 ±	1,560	2, 9	0,262
		0,7 <sup>a</sup> x	1,0 <sup>a</sup> x	0,7 <sup>a</sup> x			
	0,01 KEZ	11,50 ±	8,50 ±	9,75 ±	0,607	2, 9	0,566
		2,9 <sup>a</sup> x	1,3 <sup>a</sup> x	1,0 <sup>a</sup> x			
0,02 KEZ	9,75 ±	8,50 ±	10,75 ±	0,192	2, 9	0,829	
	3,1 <sup>a</sup> x	2,6 <sup>a</sup> x	1,9 <sup>a</sup> x				
0,05 KEZ	8,25 ±	8,50 ±	5,50 ±	0,628	2, 9	0,555	
	2,4 <sup>a</sup> x	2,9 <sup>a</sup> x	1,7 <sup>a</sup> x				
Parazitleme	9,50 ±	11,00 ±	11,00 ±	0,061	2, 9	0,941	
	1,2 <sup>a</sup> x	4,4 <sup>a</sup> x	4,1 <sup>a</sup> x				

# Her biri 1-2 günlük 4 pupun diğ er hemosit tipleri sayısı ortalamalarını göstermektedir.

\* Aynı sütunda (a) ve satırda (x) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).



**Şekil 3.12.** KEZ dozlarının ve parazitlemenin farklı zaman dönemlerinde konak pupu plazmatosit oranlarına etkileri. Pup: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış 1-2 günlük *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitlenme.



**Şekil 3.13.** KEZ dozlarının ve parazitlemenin farklı zaman dönemlerinde konak pupu diğer hücre oranlarına etkileri. Pup: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış 1-2 günlük *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitlenme.

**Tablo 3.8.** Farklı deney grupları (kontrol, parazitlenmiş ve zehir enjekte edilmiş) zaman ve etkileşimlerinin *G. mellonella* pupu farklı hemosit sayılarına etkilerini gösteren ANOVA tablosu.

Hemosit Tipi	Kaynak	sd	KO	F	P	r <sup>2</sup>
Granülosit	Deney Grupları	7	26071,923	7,189	0,000	0,51
	Zaman	2	5745,510	1,584	0,212	
	Deney Grupları x Zaman	14	5628,891	1,552	0,115	
	Hata	72	3626,597			
Plazmatosit	Deney Grupları	7	27064,161	7,471	0,000	0,52
	Zaman	2	6478,531	1,788	0,175	
	Deney Grupları x Zaman	14	5721,317	1,579	0,106	
	Hata	72	3622,81			
Diğer Hücre Tipleri	Deney Grupları	7	28,190	0,901	0,510	0,22
	Zaman	2	22,823	0,730	0,486	
	Deney Grupları x Zaman	14	28,168	0,901	0,562	
	Hata	72	31,278			

### 3.5 *P. turionellae* zehirinin konak *G. mellonella* larvası farklı hemosit sayılarına etkileri

*P. turionellae* farklı KEZ dozlarının konak *G. mellonella* son evre larvasında dolaşımdaki farklı hemosit sayılarına etkileri dört tekrarlı deney serileri ile belirlendi. Konak *G. mellonella*'da hemosit tipleri morfolojik olarak granülositler, plazmatositler, sferülositler, prohemositler ve önositoidler olarak tespit edildi. Hiçbir işleme tabi tutulmamış konak *G. mellonella* larvasında dolaşımdaki hemositlerin çoğunu granülositlerin oluşturduğu tespit edildi ve 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda granülosit oranları sırasıyla % 592,50 ± 11,2, % 598,00 ± 30,4 ve % 576,50 ± 15,2 olarak sayıldı (Tablo 3.9). Zehir enjeksiyonu granülosit sayısının 0,02 KEZ dozu üzerindeki yüksek dozlarda kontrol grupları ve 0,02 KEZ dozuna kıyasla ilk 4 saatlik periyotta (F=5,914; sd=6, 21; P=0,001) önemli oranda azalmasına neden oldu (Tablo 3.9, Şekil 3.14). Yüksek zehir dozları (> 0,02) enjeksiyonunu takiben 4 saat sonra granülositlerin toplam hemosit sayılarına oranı % 50'den az iken, kontrol grubunda

ilk 4 saatlik periyotta bu oran % 59 bulundu. Zehir enjeksiyonuna bağı olarak granüositlerin sayısında 8 (F=5,773; sd=6, 21; P=0,001) saat ve 24 (F=5,443; sd=6, 21; P=0,002) saat sonra da istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu (Tablo 3.9). 0,1 KEZ dozu enjeksiyonuna bağı olarak enjeksiyonu takiben 8 saat sonra granüosit oranları % 426,75 ± 21,5 bulunurken, 24 saat sonra bu oran % 451,50 ± 15,6 olarak hesaplandı (Tablo 3.9, Şekil 3.14). En yüksek zehir dozu olan 0.5 KEZ dozu enjeksiyonunu takiben 8 ve 24 saat sonra granüosit oranları % 444,50 ± 19,5 ve % 464,75 ± 23,6 bulundu.

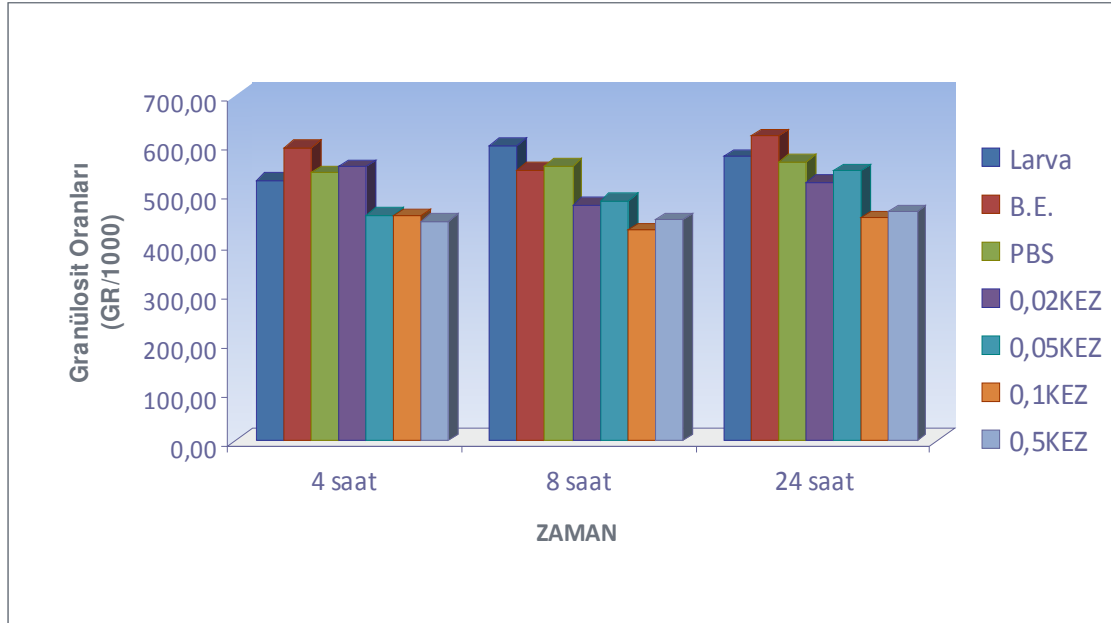
**Tablo 3.9.** Zehir enjeksiyonunun *G. mellonella* larvasında granüosit sayılarına (Granüosit/1000) etkileri.

Hemosit tipi	Deney Grupları	Granüosit Sayıları			İstatistik		
		(hücre / 1000) (Ort. ± SH) #			(ANOVA)		
		Deneyi müteakip gözlem zamanı (saat)*			F	df	P
		4	8	24			
GR	Normal Larva	592,50 ± 11,2 <sup>a x</sup>	598,00 ± 30,4 <sup>a x</sup>	576,50 ± 15,2 <sup>abx</sup>	0,293	2, 9	0,753
	Boş Enjeksiyon	595,50 ± 29,8 <sup>a x</sup>	548,00 ± 35,8 <sup>a bx</sup>	617,25 ± 40,6 <sup>a x</sup>	0,986	2, 9	0,410
	PBS Enjeksiyon	542,50 ± 9,0 <sup>a bx</sup>	556,75 ± 13,0 <sup>a bx</sup>	566,25 ± 15,0 <sup>abcx</sup>	0,903	2, 9	0,439
	0,02 KEZ	556,00 ± 48,1 <sup>a bx</sup>	479,25 ± 31,0 <sup>a bcx</sup>	523,00 ± 28,7 <sup>abcx</sup>	1,084	2, 9	0,379
	0,05 KEZ	457,50 ± 26,1 <sup>bx</sup>	486,25 ± 24,4 <sup>a bcx</sup>	547,00 ± 30,2 <sup>abcx</sup>	2,857	2, 9	0,109
	0,1 KEZ	455,50 ± 33,6 <sup>bx</sup>	426,75 ± 21,5 <sup>cx</sup>	451,50 ± 15,6 <sup>cx</sup>	0,397	2, 9	0,683
	0,5 KEZ	444,75 ± 2,9 <sup>bx</sup>	447,50 ± 19,5 <sup>bcx</sup>	464,75 ± 23,6 <sup>bcx</sup>	0,373	2, 9	0,699

# Her biri 4 larvanın granüosit sayısı ortalamalarını göstermektedir.

\* Aynı sütunda (a-c) ve satırda (x) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), GR: Granüosit.

0,1 ve 0,5 KEZ dozları enjeksiyonunu takiben 4, 8 ve 24 saat sonra granülosit oranlarında meydana gelen azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



**Şekil 3.14.** KEZ dozlarının farklı zaman dönemlerinde konak larvası granülosit oranlarına etkileri, Larva: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.

*G. mellonella* larvasında kontrol grubunda 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda plazmatositlerin oranı sırasıyla % 397,75 ± 12,9, % 390,00 ± 31,0 ve % 413,25 ± 15,3 olarak bulundu (Tablo 3.10, Şekil 3.15). Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda plazmatosit oranlarında hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol larvalarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Tablo 3.10). 0,02 KEZ dozundan büyük dozlarda enjeksiyonu takiben 4 saat (F=5,880; sd=6, 21; P=0,001) sonra plazmatosit sayılarında kontrol grubuna göre önemli bir artış gözlemlendi (Tablo 3.10). Zehir uygulamasına bağlı olarak plazmatosit sayılarında artış 8 (F=5,902; sd=6, 21; P=0,001) ve 24 (F=5,222; sd=6, 21; P=0,002) saatlik dönemlerde de ortaya çıktı. Larva için en yüksek zehir dozları olan 0,1 ve 0,5 KEZ dozlarında enjeksiyonu izleyen 8 ve 24 saatlik periyotlarda plazmatosit sayılarında meydana gelen artış hiçbir işleme tabi

tutulmamış kontrol larvalarına göre önemli bulundu (Tablo 3.10). Diğer hemosit tipleri olarak tanımlanan prohemosit, sferülosit ve önositoit sayılarında zehir dozları ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (4 s: F=0,360; sd=6, 21; P=0,896; 8 s: F=0,868; sd=6, 21; P=0,534; 24 s: F=0,218; sd=6, 21; P=0,967) (Tablo 3.11, Şekil 3.16).

**Tablo 3.10.** Zehir enjeksiyonunun *G. mellonella* larvasında plazmatosit sayılarına (Plazmatosit/1000) etkileri.

Hemosit tipi	Deney Grupları	Plazmatosit Sayıları (hücre / 1000) (Ort. ± SH) #			İstatistik (ANOVA)		
		Deneyi müteakip gözlem zamanı (saat)*			F	df	P
		4	8	24			
	Normal Larva	397,75 ± 12,9 <sup>a x</sup>	390,00 ± 31,0 <sup>a x</sup>	413,25 ± 15,3 <sup>abx</sup>	0,308	2, 9	0,742
	Boş Enjeksiyon	392,50 ± 28,5 <sup>a x</sup>	443,50 ± 36,1 <sup>a bx</sup>	374,00 ± 40,6 <sup>a x</sup>			
	PBS Enjeksiyon	448,00 ± 7,8 <sup>a bx</sup>	433,00 ± 11,9 <sup>a bx</sup>	424,00 ± 15,7 <sup>abcx</sup>			
PL	0,02 KEZ	433,75 ± 50,0 <sup>a bx</sup>	511,75 ± 30,7 <sup>bcx</sup>	467,75 ± 29,1 <sup>abcx</sup>	1,070	2, 9	0,383
	0,05 KEZ	535,00 ± 25,7 <sup>bx</sup>	505,50 ± 24,5 <sup>a bcx</sup>	444,00 ± 32,0 <sup>abcx</sup>			
	0,1 KEZ	534,00 ± 33,9 <sup>bx</sup>	563,50 ± 22,3 <sup>cx</sup>	538,25 ± 16,1 <sup>cx</sup>			
	0,5 KEZ	545,00 ± 1,6 <sup>bx</sup>	542,75 ± 17,8 <sup>bcx</sup>	526,25 ± 23,6 <sup>bcx</sup>			

# Her biri 4 larvanın plazmatosit sayısı ortalamalarını göstermektedir.

\* Aynı sütunda (a-c) ve satırda (x) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), GR: Granülosit.

Çift yönlü ANOVA sonuçlarına göre zehir enjeksiyonunun konak larvası farklı hemosit sayılarına etkileri granülositler (deney grupları: P=0,000; zaman: P=0,128) ve plazmatositler (deney grupları: P=0,000; zaman: P=0,136) için deney gruplarına bağlı ancak zamana bağlı değildi ve her iki hemosit tipi için zehir dozları ile hemosit sayısı arasındaki ilişki zamandan etkilenmedi (sırasıyla P=0,506 ve P=0,481) (Tablo 3.12). Bununla beraber zehir dozları (P=0,797) ve enjeksiyonu takiben geçen zaman (P=0,871) diğer hemosit tipleri sayılarına etkide bulunmazken, zehir dozları ile hemosit sayısı arasındaki ilişki zamandan etkilenmedi (P=0,980) (Tablo 3.12).

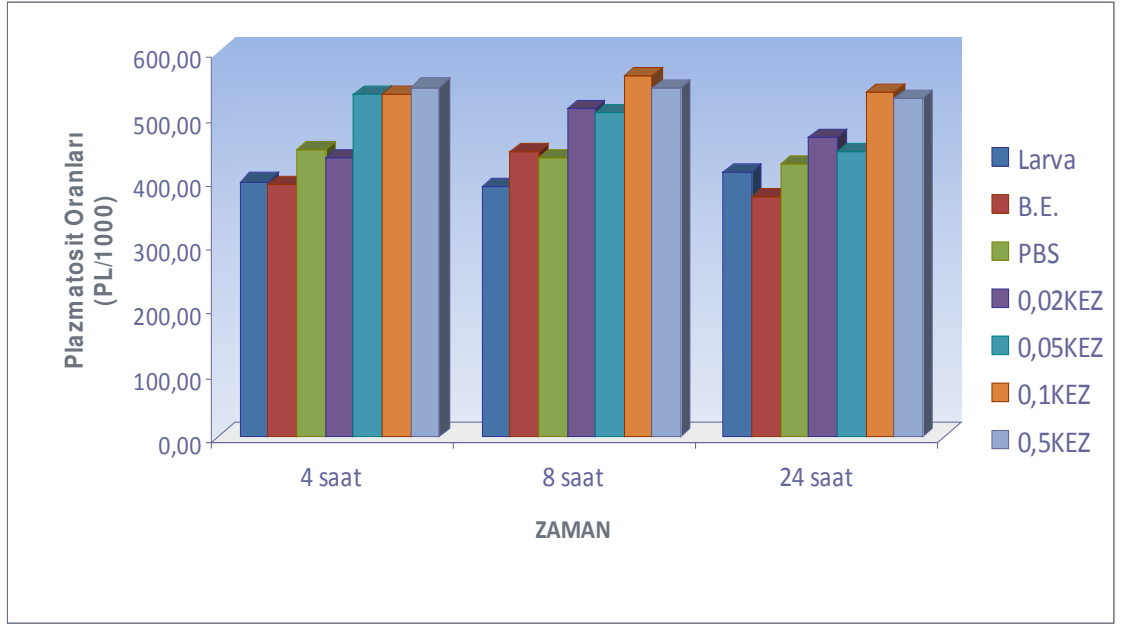
**Tablo 3.11.** Zehir enjeksiyonunun *G. mellonella* larvasında diğer hemosit tipi sayılarına (DH/1000) etkileri.

Hemosit tipi	Deney Grupları	Diğer Hemosit Tipi Sayıları (hücre / 1000) (Ort. ± SH) #			İstatistik (ANOVA)		
		Deneyi müteakip gözlem zamanı (saat)*			F	df	P
		4	8	24			
	Normal Larva	9,75 ± 1,8 <sup>a</sup> x	12,00 ± 2,1 <sup>a</sup> x	10,25 ± 2,2 <sup>a</sup> x	0,336	2, 9	0,723
	Boş Enjeksiyon	12,00 ± 3,8 <sup>a</sup> x	8,50 ± 1,3 <sup>a</sup> x	8,75 ± 1,3 <sup>a</sup> x	0,642	2, 9	0,549
	PBS Enjeksiyon	9,50 ± 1,7 <sup>a</sup> x	10,25 ± 1,7 <sup>a</sup> x	9,75 ± 1,1 <sup>a</sup> x	0,065	2, 9	0,937
DH	0,02 KEZ	10,25 ± 3,6 <sup>a</sup> x	9,00 ± 0,4 <sup>a</sup> x	9,25 ± 0,6 <sup>a</sup> x	0,265	2, 9	0,773
	0,05 KEZ	7,50 ± 4,2 <sup>a</sup> x	8,25 ± 1,4 <sup>a</sup> x	9,00 ± 1,8 <sup>a</sup> x	0,267	2, 9	0,771
	0,1 KEZ	10,50 ± 2,8 <sup>a</sup> x	9,75 ± 2,1 <sup>a</sup> x	10,25 ± 1,1 <sup>a</sup> x	0,034	2, 9	0,967
	0,5 KEZ	10,25 ± 1,4 <sup>a</sup> x	8,00 ± 0,7 <sup>a</sup> x	9,00 ± 0,0 <sup>a</sup> x	0,179	2, 9	0,839

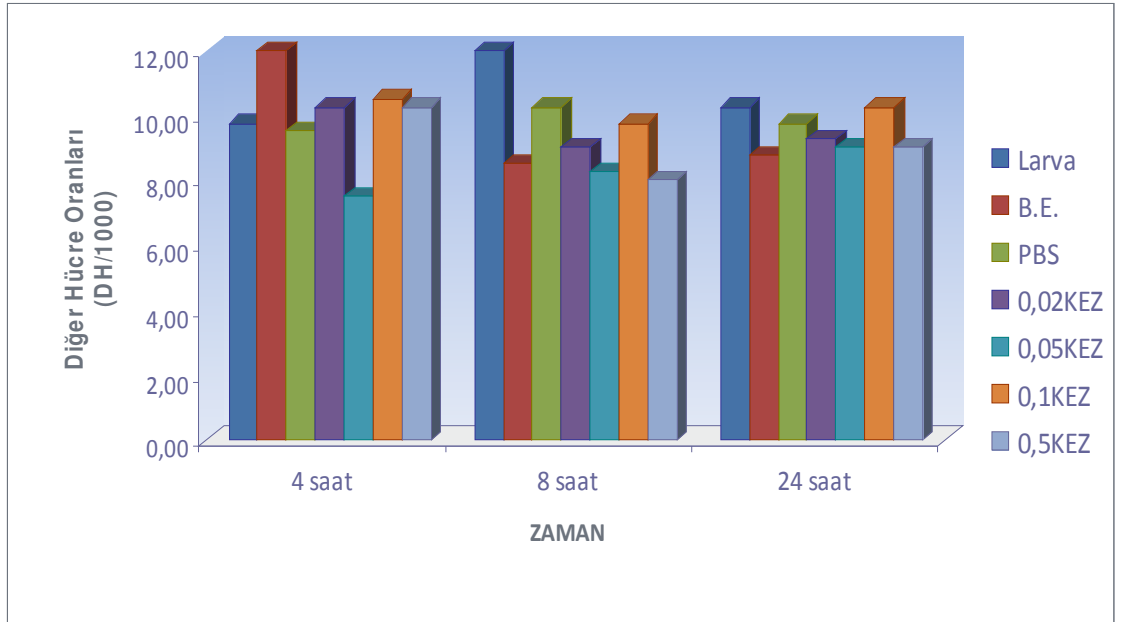
# Her biri 4 larvanın diğer hemosit tipleri sayısı ortalamalarını göstermektedir.

\* Aynı sütunda (a) ve satırda (x) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05), DH: Diğer hemosit tipleri.





**Şekil 3.15.** KEZ dozlarının farklı zaman dönemlerinde konak larvası plazmatosit oranlarına etkileri, Larva: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.



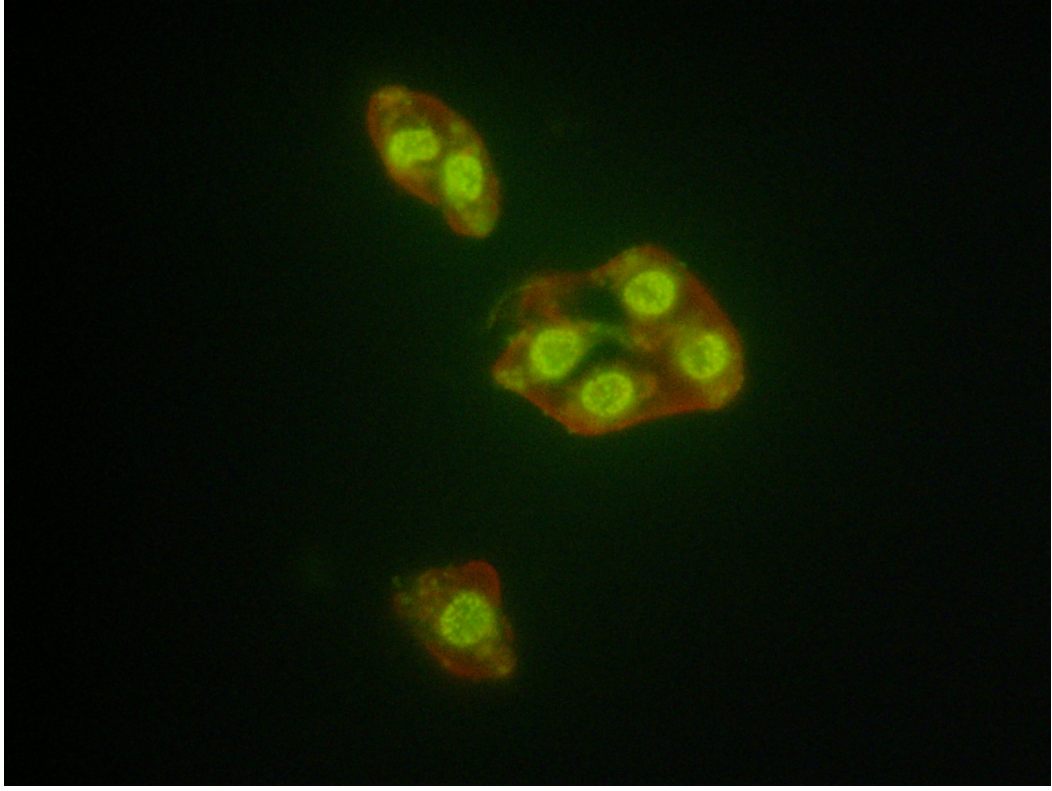
**Şekil 3.16.** KEZ dozlarının farklı zaman dönemlerinde konak larvası diğer hücre oranlarına etkileri, Larva: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.

**Tablo 3.12.** Farklı deney grupları (kontrol ve zehir enjekte edilmiş) zaman ve etkileşimlerinin *G. mellonella* larvası farklı hemosit sayılarına etkilerini gösteren ANOVA tablosu.

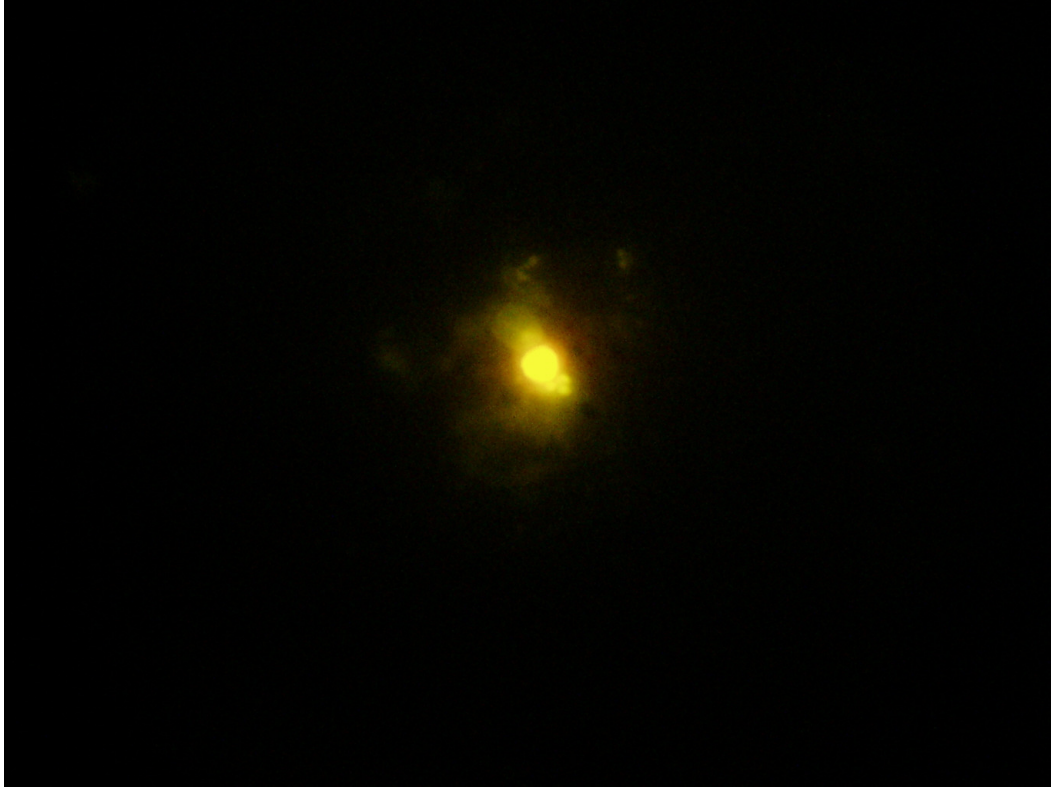
Hemosit Tipi	Kaynak	sd	KO	F	P	r <sup>2</sup>
Granülosit	Deney Grupları	6	42544,968	15,258	0,000	0,63
	Zaman	2	5930,583	2,127	0,128	
	Deney Grupları x Zaman	12	2646,263	0,949	0,506	
	Hata	63	3626,597			
Plazmatosit	Deney Grupları	6	42853,298	15,072	0,000	0,63
	Zaman	2	5859,476	2,061	0,136	
	Deney Grupları x Zaman	12	2774,601	0,976	0,481	
	Hata	63	2843,238			
Diğer Hücre Tipleri	Deney Grupları	6	6,631	0,513	0,797	0,10
	Zaman	2	1,798	0,139	0,871	
	Deney Grupları x Zaman	12	4,298	0,332	0,980	
	Hata	63	12,937			

### 3.6 *P. turionellae* zehiri ve parazitlemesinin konak *G. mellonella* pupunda apoptotik indekse etkileri

*P. turionellae* zehiri ve parazitlemesinin konak *G. mellonella* pupal hemositlerinde apoptotik indekse etkileri üç tekrarlı deney serileri ile belirlendi. Acridine Orange/ Ethidium Bromide boyama tekniği kullanılarak hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesi sonucu pupal evrede normal hemositler (Şekil 3.17), erken apoptotik (Şekil 3.18, 3.19), geç apoptotik (Şekil 3.20) ve nekrotik (Şekil 3.21) hemositler görülmektedir. Tablo 3.13’de görüldüğü gibi hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupalarında 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda erken apoptotik hemositlerin oranı sırasıyla % 1,80, % 2,53 ve % 2,67 olarak hesaplandı. Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda erken apoptotik hemositlerin oranında hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupalarına kıyasla farklılık bulunmadı (Tablo 3.13, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24). 0,005, 0,01 ve 0,02 KEZ

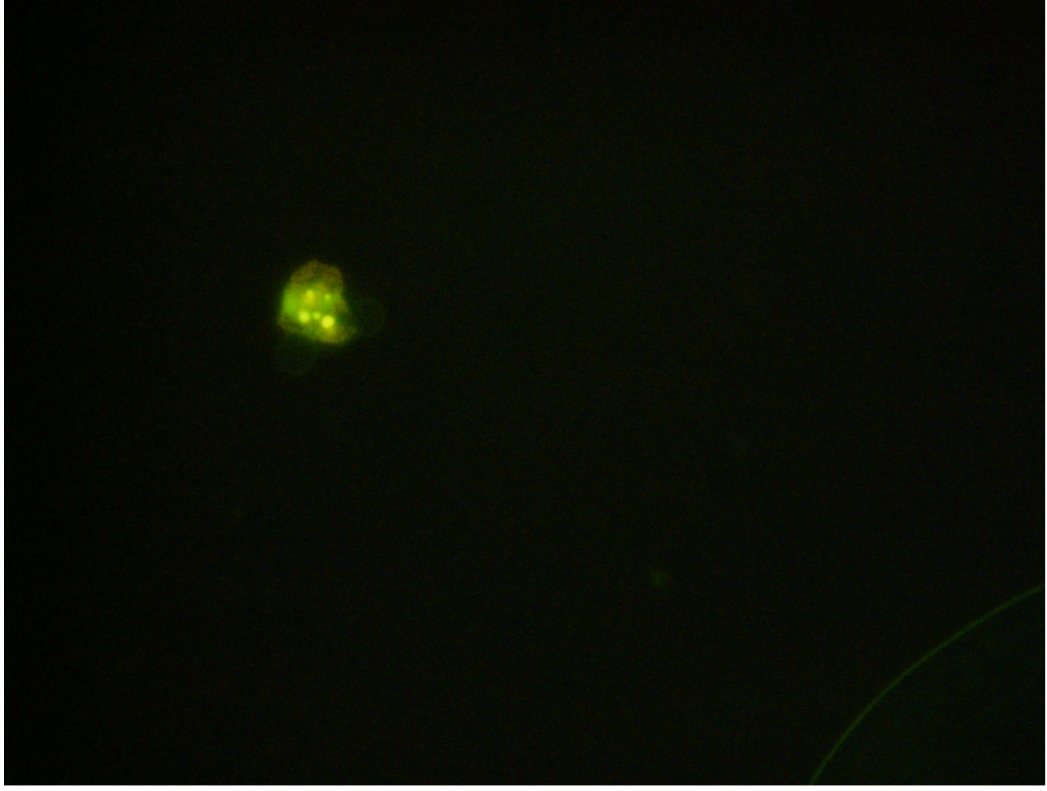


**Şekil 3.17.** Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış *G. mellonella* pupal hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri. Büyütme: 1000X.

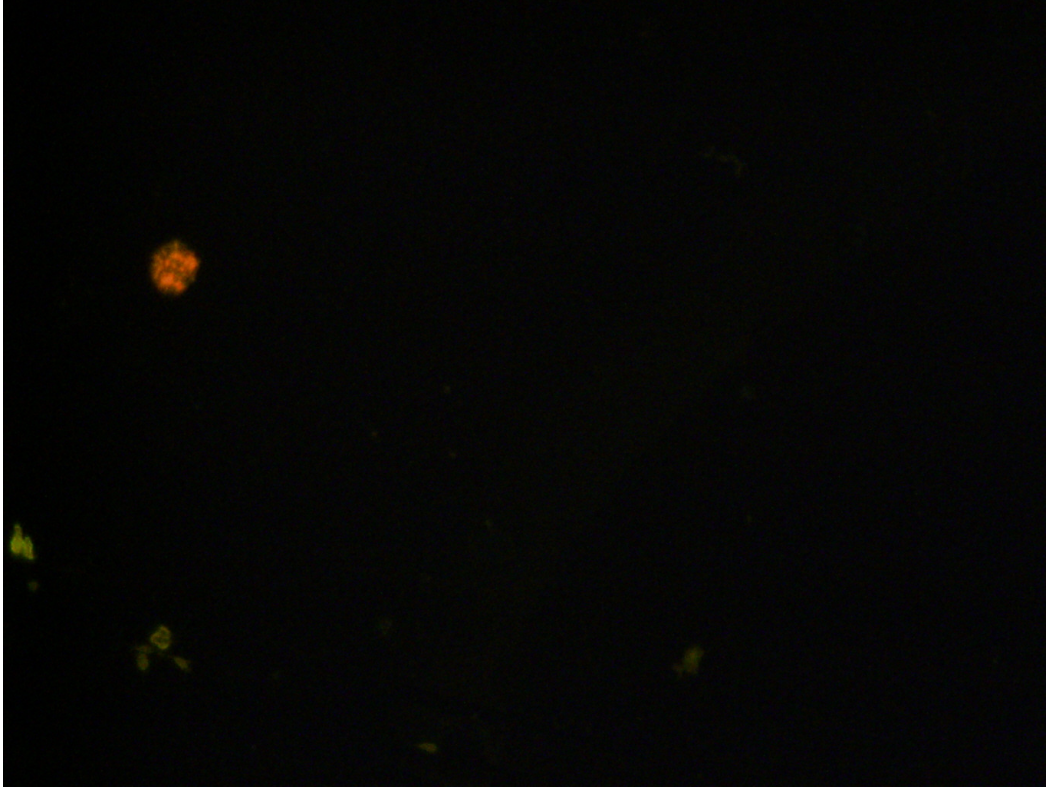


**Şekil 3.18.** *G.mellonella* pup evresinde erken apoptotik bir hemosit. Büyütme: 1000X.





**Şekil 3.19.** *G. mellonella* pup evresinde erken apoptotik bir hemosit. Büyütme: 1000X.



**Şekil 3.20.** *G. mellonella* pup evresinde geç apoptotik bir hemosit. Büyütme: 1000X.



**Şekil 3.21.** *G. mellonella* pup evresinde nekrotik bir hemosit. Büyütme: 1000X.

dozları, enjeksiyonu takiben 4, 8 ve 24 saatlik dönemlerde erken apoptotik hemositlerin oranında kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış göstermedi (Tablo 3.13). *G. mellonella* pupuna 0,05 KEZ dozu enjeksiyonunu müteakip dolaşımdaki hemositlerin % 10'undan fazlası 4 (F=6,872; sd= 7, 16; P= 0,001) ve 8 (F=10,686; sd= 7, 16; P= 0,000) saatlik periyotlarda erken apoptotik evrede gözlemlendi. Hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupalarında geç apoptotik evredeki hemositlerin oranı 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda sırasıyla % 1,73, % 1,53 ve % 1,67 olarak hesaplandı (Tablo 3.13, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24). Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda geç apoptotik hemositlerin oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Bununla beraber, pupal evrede geç apoptotik hemositlerin oranı 0,01 ve 0,02 KEZ dozlarında 24 saatlik dönemde (F= 11,247; df= 7, 16; P= 0,000) ve yine 0,02 KEZ dozunda 4 (F= 4,355; sd= 7, 16, P= 0,007) ve 8 (F= 8,860; sd= 7, 16; P= 0,000) saatlik dönemde artış gösterdi. Bu artış kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı. Benzer şekilde en yüksek zehir dozu olan 0,05 dozunda 8 saatlik dönemde erken apoptotik hemositlerin oranında kontrol gruplarına kıyasla önemli bir artma gözlemlendi (Tablo 3.13).

**Tablo 3.13.** Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G.mellonella* pup evresinde erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücrelerin (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri.

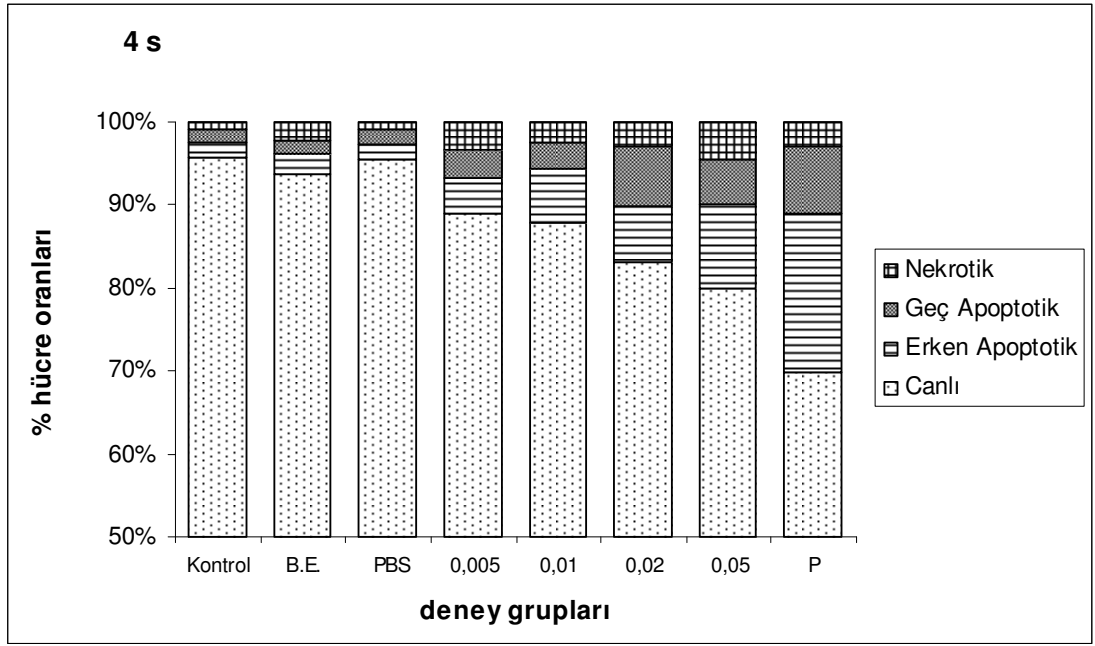
Deney Grupları <sup>#</sup>	Apoptotik İndeks (%)											
	Erken Apoptozis			Geç Apoptozis			Nekroz			Canlı		
	4 s.	8 s.	24 s.	4 s.	8 s.	24 s.	4 s.	8 s.	24 s.	4 s.	8 s.	24 s.
Normal Pup	1,80	2,53	2,67	1,73	1,53	1,67	0,80	1,40	0,53	95,67	94,53	95,13
	a x	a x	a x	a x	a x	ab x	a x	ab x	a z	a y	a y	a y
Boş enjeksiyon	2,33	2,80	1,73	1,73	1,67	1,07	2,20	1,27	1,20	93,73	94,27	96,00
	a x	a x	a x	a x	a x	a x	ab x	ab x	ab x	a y	a y	a y
PBS	2,00	2,27	2,20	1,67	1,20	1,13	0,93	0,73	1,07	95,40	95,80	95,60
	a x	a x	a x	a x	a xz	a x	a x	a z	a x	a y	a y	a y
0,005 KEZ	4,40	4,53	6,07	3,33	2,47	2,00	3,40	2,53	2,07	88,87	90,47	89,87
	a x	ab x	ab x	ab x	ab x	abc x	ab x	ab x	ab x	ab y	ab y	ab y
0,01 KEZ	6,33	7,73	9,47	3,20	4,60	4,67	2,53	3,80	2,67	87,93	83,87	83,20
	a x	ab x	ab x	ab x	abc x	cd x	ab x	b x	ab x	ab y	b y	bc y
0,02 KEZ	6,80	6,47	10,67	7,27	5,67	4,80	2,93	2,80	2,80	83,00	85,07	81,73
	a x	ab x	ab x	b x	bc x	cd xz	ab z	ab x	ab z	b y	b y	bc y
0,05 KEZ	10,27	10,67	7,33	5,40	5,80	3,87...	4,47	2,80	2,87	79,87	80,73	85,93
	ab x	bc x	ab x	ab x	bc z	bcd x	b x	ab z	ab x	bc y	bc y	b y
Parazitleme	19,13	17,20	15,80	8,07	9,00	7,20	2,93	4,00	4,53	69,87	69,80	72,47
	b x	c x	b x	b xz	c xz	d x	ab z	b z	b x	c y	c y	c y

<sup>#</sup>Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

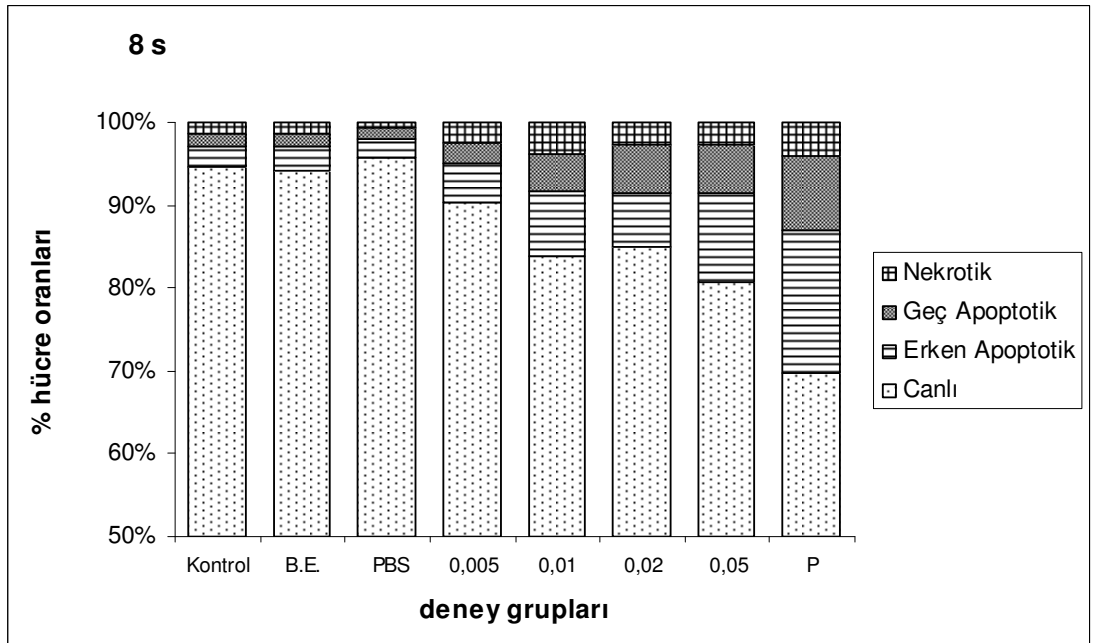
\* Aynı sütunda (a-d) ve satırda (x-z) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05)

*G.mellonella* dolaşımındaki erken ve geç apoptotik hemositler en yüksek oranda parazitlenmiş puplarda gözlemlendi. Parazitlenme sonucu erken apoptotik hemositlerin oranları 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda sırasıyla % 19,13, % 17,20 ve % 15,80 bulunurken, geç apoptotik hemositlerin oranları % 8,07, % 9,00 ve % 7,20 olarak hesaplandı (Tablo 3.13, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24). Parazitlemeye bağlı erken ve geç apoptotik hemositlerin oranında görülen artış hiçbir işleme tabi tutulmamış, boş enjeksiyon yapılmış ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplara göre istatistiksel olarak önemli bulundu. Tüm zehir dozlarında, parazitlenmiş gruplarda ve tüm zaman dönemlerinde dolaşımdaki erken apoptotik ve geç apoptotik hemositlerin oranı nekrotik hemositlere göre fazlaydı. Hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* puplarında nekrotik hemositlerin oranları 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda sırasıyla % 0,80, % 1,40 ve % 0,53 olarak bulundu (Tablo 3.13, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24). Pupal evrede dolaşımdaki nekrotik hemositlerin oranında meydana gelen artmalar hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol puplarına kıyasla sadece 0,05 dozunda (% 4,47) 4 (F= 3,908; sd = 7, 16; P= 0,011) saatlik ve parazitlenmiş gruplarda (% 4,53) 24 (F= 3,657; sd= 7,16; P= 0,015) saatlik periyotta istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 3.13). Hücre canlılıkları ise hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol puplarında 4, 8 ve 24 saatlik dönemlerde sırasıyla %95,67, %94,53 ve %95,13 olarak hesaplandı (Tablo 3.13, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24). Hemosit canlılıklarında zehir dozları ve parazitlemeye bağlı anlamlı azalmalar 0,005 KEZ dozundan büyük dozlarda ve parazitlenmiş gruplarda 4 (F= 13,235; sd=7,16; P= 0,000), 8 (F= 15,721; sd= 7,16; P=0,000) ve 24 (F= 14,737; sd= 7,16; P=0,000) saatlik dönemlerde gözlemlendi (Tablo 3.13). *G. mellonella* pupunda hemosit canlılıklarının en düşük değerleri parazitlenmiş gruplarda görüldü ve parazitlemeyi takiben 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda % 69,87, % 69,80 ve % 72,47 olarak hesaplandı (Tablo 3.13, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24).

Üç yönlü ANOVA sonuçlarına göre zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin konak *G. mellonella* pupal hemositlerinde apoptotik ve nekrotik indekse etkisi deney gruplarına (P=0,001) ve hücre durumlarına bağlı (P=0,000) ancak zamana (P=0,875) bağlı değildir (Tablo 3.14).

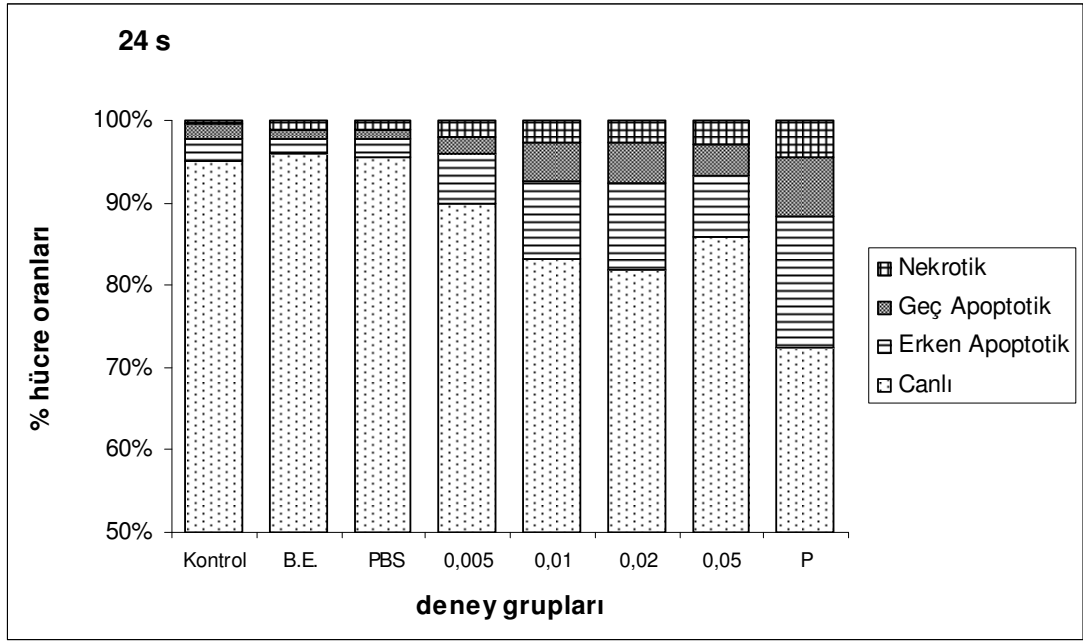


**Şekil 3.22.** Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 4 saatlik dönemde konak pupu apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları. Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitleme.



**Şekil 3.23.** Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 8 saatlik dönemde konak pupu apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları. Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitleme.





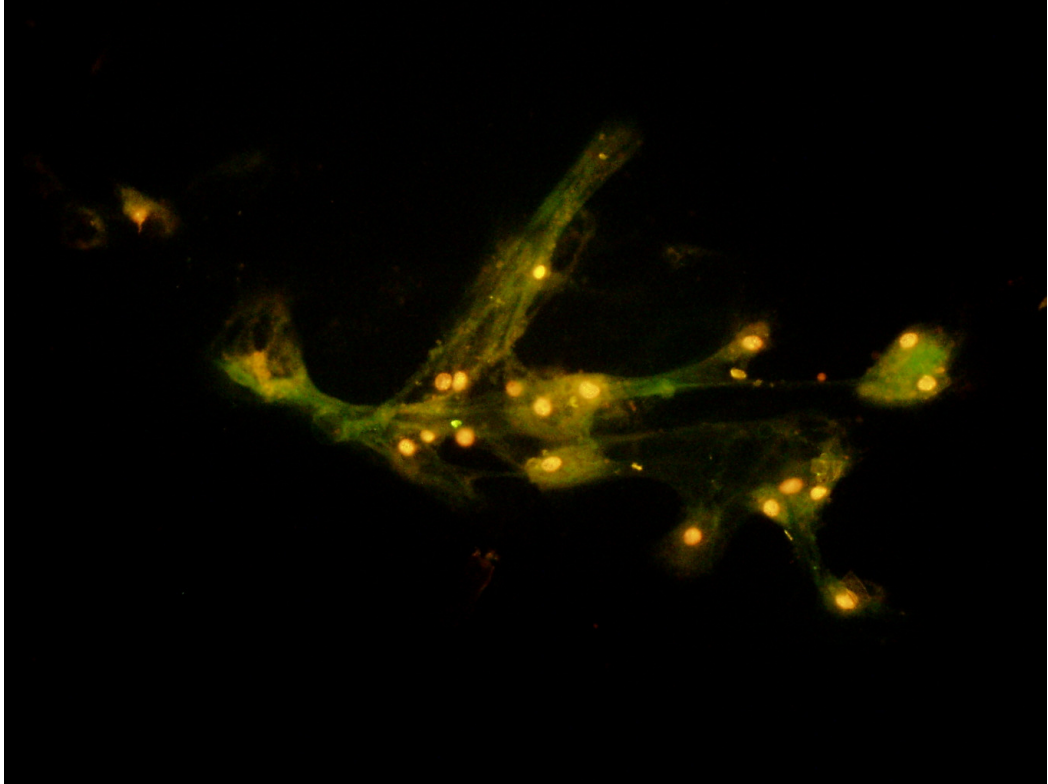
**Şekil 3.24.** Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 24 saatlik dönemde konak pupu apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları. Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitleme.

**Tablo 3.14.** Farklı deney grupları, hücre durumları (erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı) ve zaman ve etkileşimlerinin *G. mellonella* pupu apoptotik ve nekrotik indekse etkilerini gösteren ANOVA tablosu.

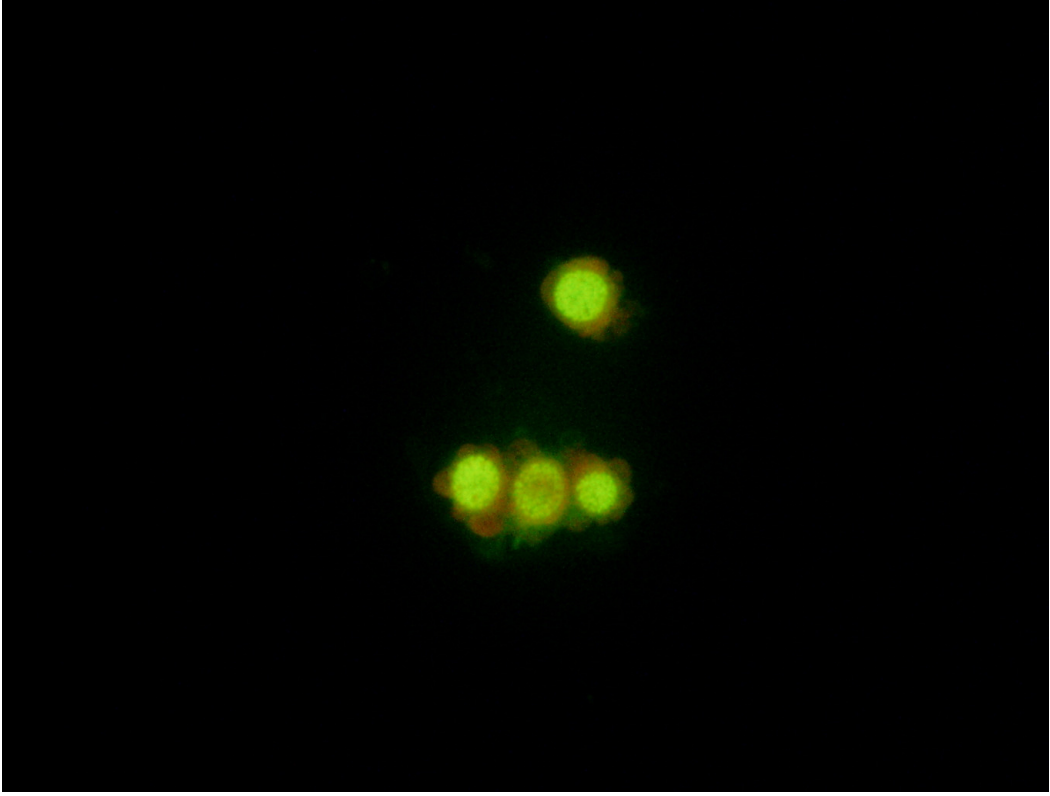
Evre	Kaynak	sd	KO	F	P	$r^2$
Pup	Deney Grupları	7	0,011	3,832	0,001	0,991
	Zaman	2	0,000	0,134	0,875	
	Hücre Durumları	3	19,211	6741,480	0,000	
	Deney Grupları x zaman	14	0,000	0,066	1,000	
	Deney Grupları x Hücre Durumları	21	0,090	31,570	0,000	
	Zaman x Hücre Durumları	6	0,002	0,551	0,769	
	Deney Grupları x Hücre Durumları x Zaman	42	0,002	0,719	0,897	
	Hata	192	0,003			

### 3.7 *P. turionellae* zehir enjeksiyonunun konak *G. mellonella* larvasında apoptotik indekse etkileri

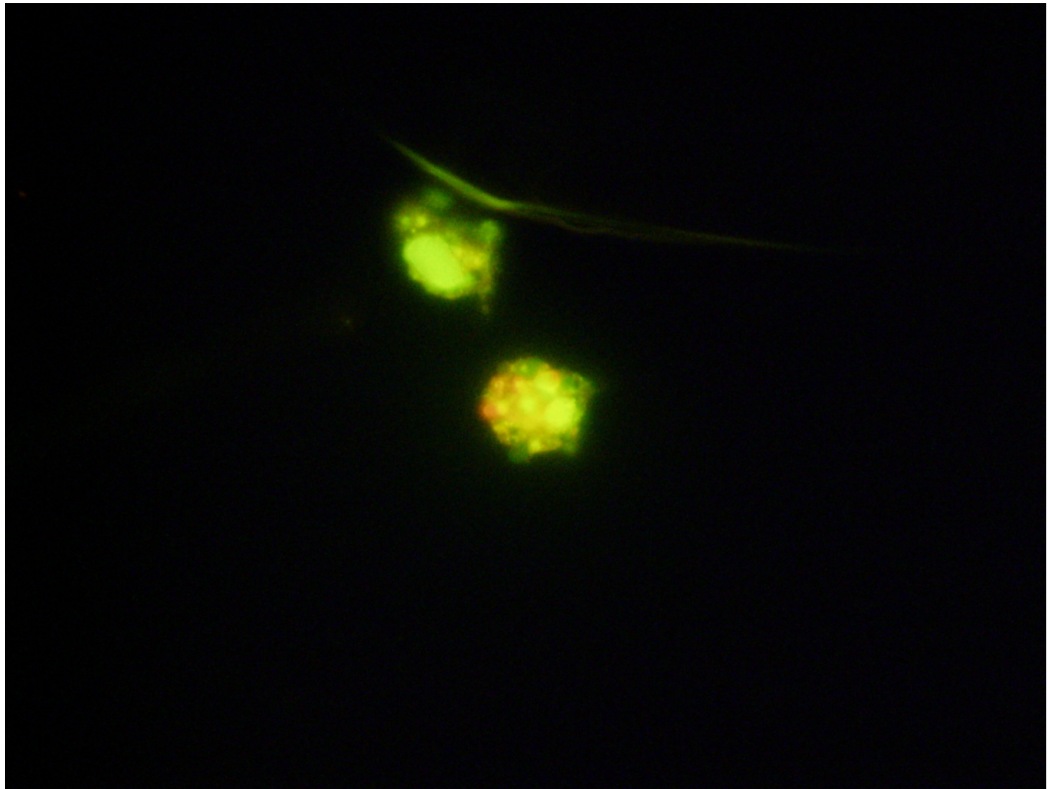
*P. turionellae* zehir enjeksiyonunun konak *G. mellonella* larval hemositlerinde apoptotik indekse etkileri üç tekrarlı deney serileri ile belirlendi. Acridine Orange/Ethidium Bromide boyama tekniği kullanılarak hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesi sonucu larval evrede normal hemositler (Şekil 3.25, Şekil 3.26), erken apoptotik (Şekil 3.27, Şekil 3.28), geç apoptotik (Şekil 3.29) ve nekrotik (Şekil 3.30) hemositler görülmektedir. Tablo 3.15'de görüldüğü gibi hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvalarında 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda erken apoptotik hemositlerin oranı sırasıyla % 0,47, % 0,67 ve % 1,00 olarak bulundu. Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda erken apoptotik hemositlerin oranı hiçbir işleme tabi tutulmamış kona larvasına benzerlik gösterdi (Tablo 3.15). *G. mellonella* larvasında zehir enjeksiyonuna bağlı olarak apoptotik ve nekrotik



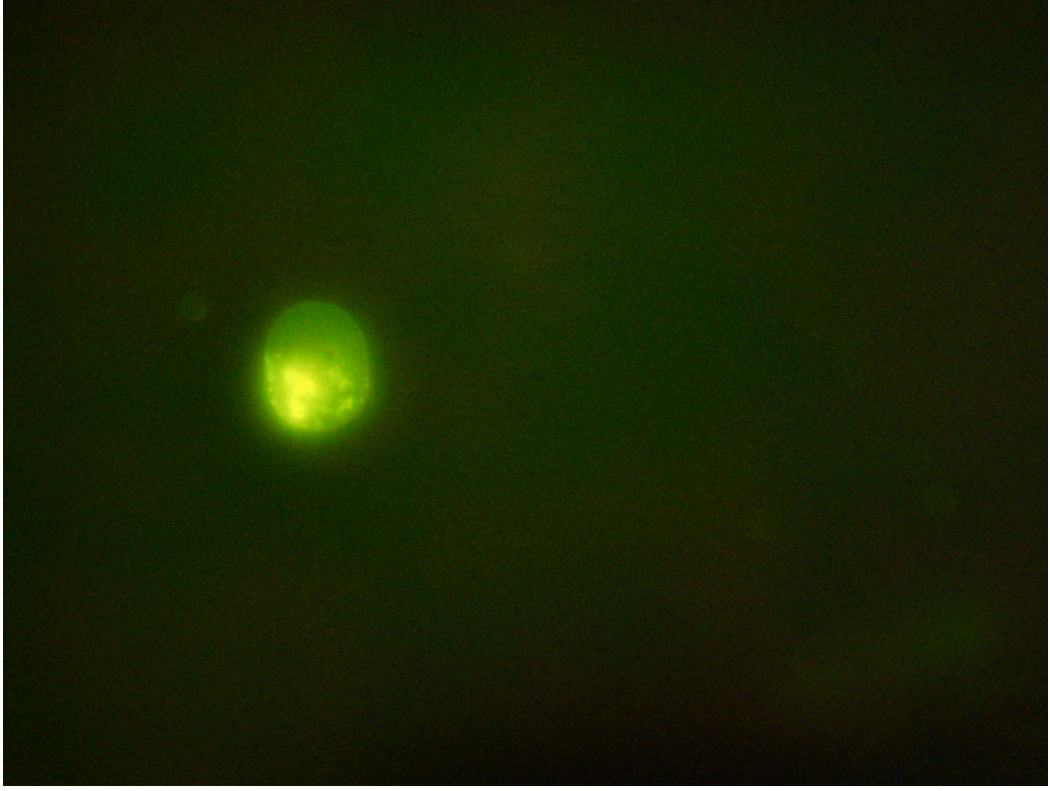
**Şekil 3.25.** Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış *G. mellonella* larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri. Büyütme: 400X.



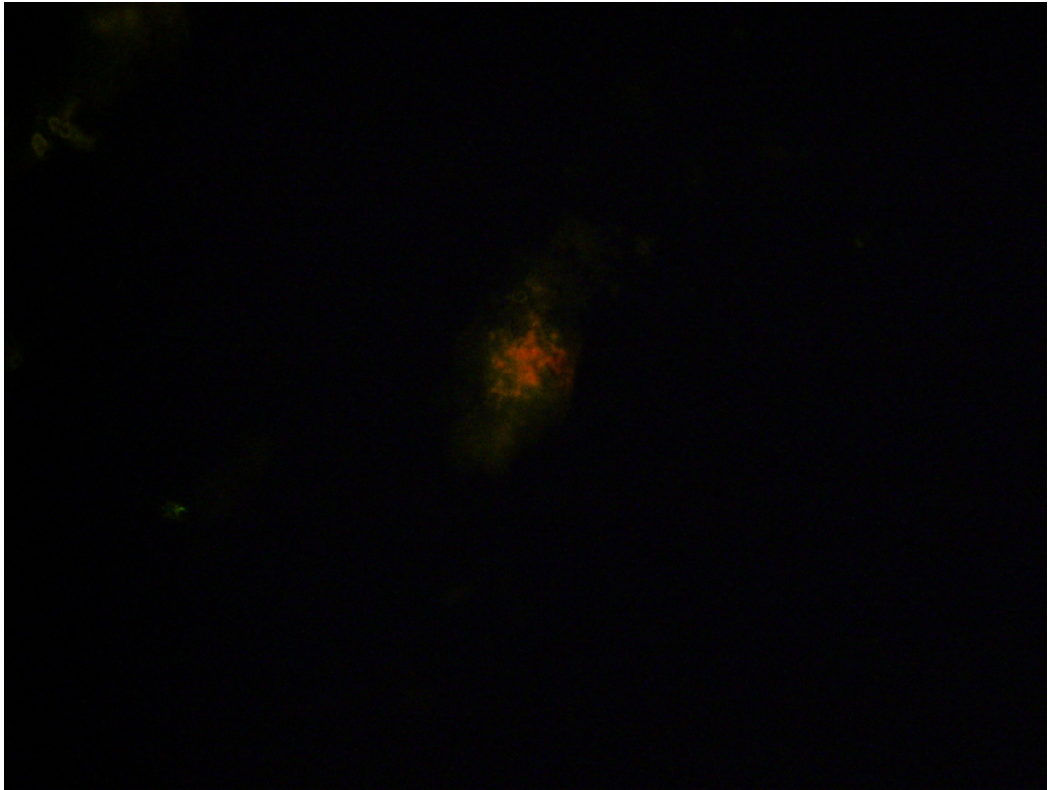
**Şekil 3.26.** Acridine Orange ve Ethidium Bromide ile boyanmış *G. mellonella* larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri. Büyütme: 1000X.



**Şekil 3.27.** *G. mellonella* larva evresinde erken apoptotik hemositler. Büyütme: 1000X.

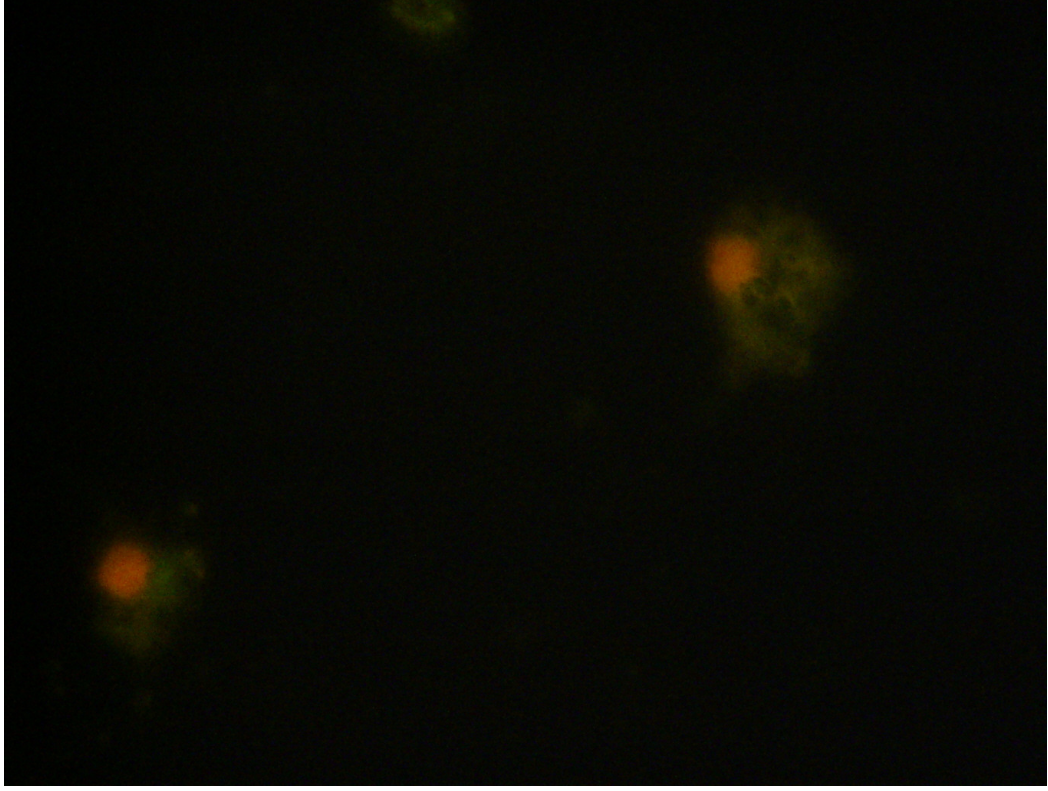


**Şekil 3.28.** *G. mellonella* larva evresinde erken apoptotik bir hemosit. Büyütme: 1000 X.



**Şekil 3.29.** *G. mellonella* larva evresinde geç apoptotik bir hemosit. Büyütme: 1000X.





**Şekil 3.30.** *G. mellonella* larva evresinde nekrotik hemositler. Büyütme: 1000X.

hücrelerin oranı pupal evredeki kadar olmasa da zehir dozuna bağlı olarak artış gösterdi (Tablo 3.15, Şekil 3.31, Şekil 3.32, Şekil 3.33). Ancak 0,02 ve 0,05 KEZ dozlarında erken apoptotik hemositlerin sayısında meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 3.15). Bununla beraber 0,5 KEZ dozunda ilk 4 (F= 4,252; sd= 6, 14; P= 0,012) saatlik periyotta ve 0,1 ve 0,5 KEZ dozlarında 8 (F= 14,048; sd= 6, 14; P= 0,000) saatlik periyotta ortaya çıkan artış istatistiksel olarak önemliydi (Tablo 3.15). Hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvalarında geç apoptotik hemositlerin oranı 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda sırasıyla % 0,40, % 0,27 ve % 0,33 olarak bulundu (Tablo 3.15, Şekil 3.31, Şekil 3.32, Şekil 3.33). Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda da geç apoptotik hemositlerin oranı kontrol grubuna benzerlik gösterdi (Tablo 3.15). *P. turionellae* zehir enjeksiyonuna bağlı olarak geç apoptotik hemositlerin oranında ilk 4 saatlik dönemde hiçbir KEZ dozunda kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi (F= 2,391; sd= 6, 14; P=0,084). Bununla beraber larva için en yüksek zehir dozu olan 0,1 ve 0,5 KEZ dozlarında 8 (F= 8,322; sd=6, 14; P= 0,001)

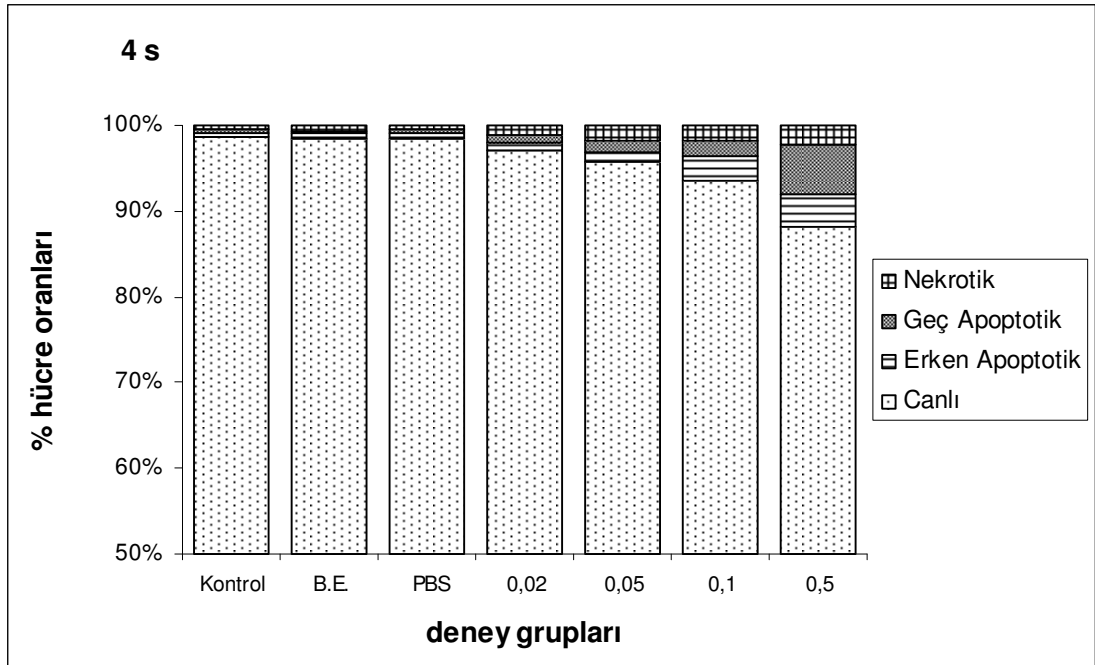
**Tablo 3.15.** *P. turionellae* zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücrelerin (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri.

Deney Grupları <sup>#</sup>	Apoptotik İndeks (%)											
	Erken Apoptozis			Geç Apoptozis			Nekroz			Canlı		
	4 s.	8 s.	24 s.	4 s.	8 s.	24 s.	4 s.	8 s.	24 s.	4 s.	8 s.	24 s.
Normal Larva	0,47	0,67	1,00	0,40	0,27	0,33	0,47	0,20	0,40	98,67	98,87	98,27
	a x	a x	a x	a x	a x	a x	a x	a x	a x	a y	a y	a y
Boş enjeksiyon	0,67	0,73	0,80	0,33	0,60	0,27	0,67	0,27	0,47	98,33	98,40	98,47
	ab x	a x	a x	a x	ab x	a x	a x	a x	a x	a y	a y	a y
PBS	0,73	0,60	0,73	0,33	0,40	0,53	0,47	0,73	0,53	98,47	98,27	98,20
	ab x	a x	a x	a x	ab x	a x	a x	a x	a x	a y	a y	a y
0,02 KEZ	0,80	0,80	1,60	0,93	0,67	0,67	1,13	1,27	0,80	97,13	97,27	96,93
	ab x	a x	a x	a x	ab x	a x	a x	a x	a x	a y	a y	a y
0,05 KEZ	1,07	1,00	1,13	1,40	0,87	1,67	1,73	1,27	0,67	95,80	96,87	96,53
	ab x	a x	a x	a x	ab x	ab x	a x	a x	a x	ab y	a y	a y
0,1 KEZ	3,00	3,73	5,13	1,67	1,47	3,87	1,80	1,13	1,60	93,53	93,67	89,40
	ab x	b x	a x	a x	bc x	b x	a x	a x	a x	ab y	b y	b y
0,5 KEZ	3,80	5,20	4,80	5,67	2,53	5,47	2,33	1,93	1,93	88,20	90,33	87,80
	b x	b x	a x	a x	c x	b x	a x	a x	a x	b y	b y	b y

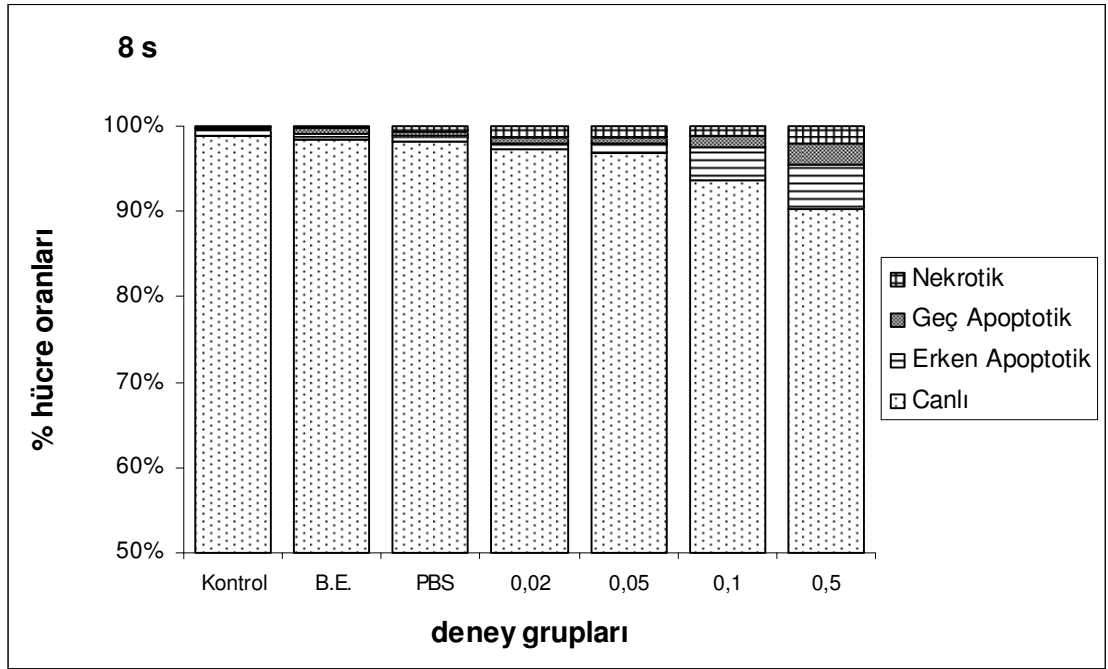
<sup>#</sup>Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

<sup>\*</sup>Aynı sütunda (a-c) ve satırda (x-y) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05)

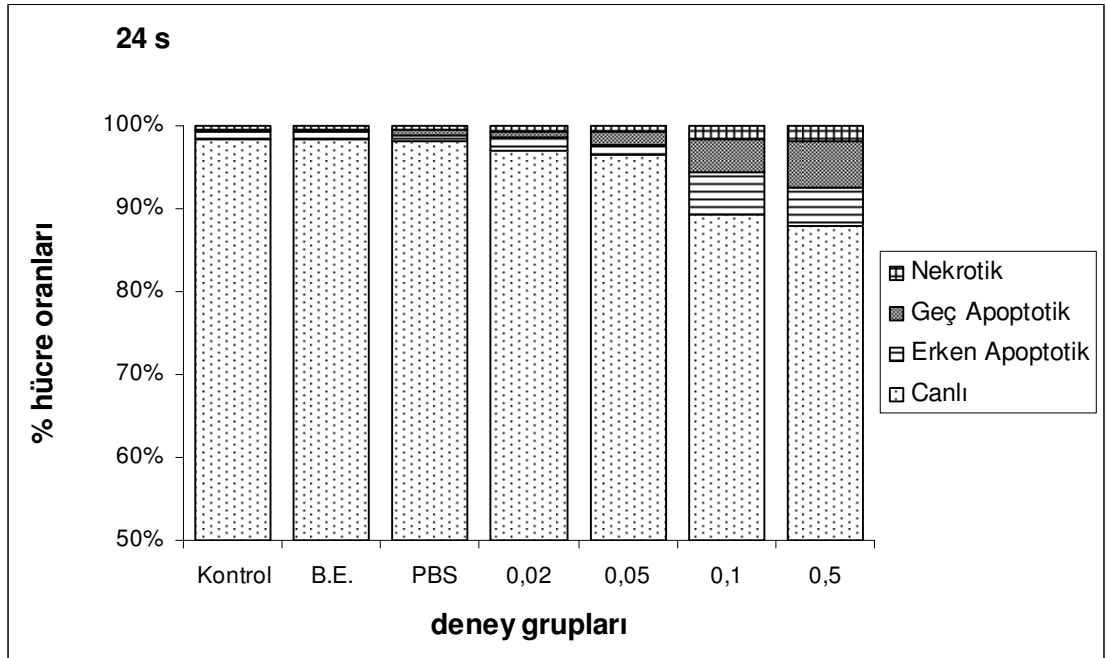
ve 24 (F= 8,649; sd= 6, 14; P=0,000) saatlik dönemlerde geç apoptotik hemositlerin oranında meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 3.15). Hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvalarında dolaşımdaki nekrotik hemositlerin oranı 4, 8 ve 24 saatlik dönemlerde sırasıyla % 0,47, % 0,20 ve % 0,40 olarak tespit edildi (Tablo 3.15, Şekil 3.31, Şekil 3.32, Şekil 3.33). Boş enjeksiyon, PBS enjeksiyonu yapılmış ve zehir enjekte edilmiş gruplarda nekrotik hemositlerin oranı % 0,27 - % 2,33 aralığında bulundu ve yapılan üç tekrarın istatistiksel analizi sonucu hiçbir KEZ dozunda nekrotik hemositlerin oranında anlamlı bir farklılık bulunmadı (4 s; F= 2,681; sd= 6, 14; P=0,059, 8 s; F= 1,489; sd= 6, 14; P=0,252, 24 s; F= 2,033; sd= 6, 14; P=0,129). Kontrol larvalarında 4, 8 ve 24 saatlik dönemlerde hücre canlılıkları % 98,67, % 98,87 ve 98,27 olarak hesaplandı (Tablo 3.15, Şekil 3.31, Şekil 3.32, Şekil 3.33). Kontrol grupları ve düşük zehir dozlarına kıyasla hemosit canlılıklarında önemli azalmalar 0,1 KEZ dozunda 8 ve 24 saatte, 0,5 KEZ dozunda ise 4 (F=5,397; sd=6,14; P= 0,004), 8 (F= 18,240; sd=6, 14; P=0,000) ve 24 (F=8,571; sd= 6, 14; P=0,000) saatlik dönemlerde gözlemlendi (Tablo 3.15).



**Şekil 3.31.** Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 4 saatlik dönemde konak larvası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları. Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.



**Şekil 3.32.** Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 8 saatlik dönemde konak larvası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları. Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.



**Şekil 3.33.** Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak 24 saatlik dönemde konak larvası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları. Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.



Tablo 3.16’da *P. turionellae* zehir enjeksiyonunun konak *G. mellonella* larval hemositlerinde apoptotik ve nekrotik indekse etkilerini gösteren ANOVA tablosu görülmektedir. Üç yönlü ANOVA sonuçlarına göre zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin konak *G. mellonella* larval hemositlerinde apoptotik ve nekrotik indekse etkisi deney gruplarına (P=0,002) ve hücre durumlarına bağlı (P=0,000) ancak zamana (P=0,939) bağlı değildir (Tablo 3.16).

**Tablo 3.16.** Farklı deney grupları, hücre durumları (erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı) ve zaman ve etkileşimlerinin *G. mellonella* larvası apoptotik ve nekrotik indekse etkilerini gösteren ANOVA tablosu.

Evre	Kaynak	sd	KO	F	P	r <sup>2</sup>
Larva	Deney Grupları	6	0,008	3,548	0,002	
	Zaman	2	0,000	0,063	0,939	
	Hücre Durumları	3	25,717	11692,45	0,000	
	Deney Grupları x Zaman	12	0,000	0,100	1,000	
	Deney Grupları x Hücre Durumları	18	0,042	19,032	0,000	0,995
	Zaman x Hücre Durumları	6	0,003	1,224	0,297	
	Deney Grupları x Hücre Durumları x Zaman	36	0,001	0,591	0,968	
	Hata	168	0,002			

### 3.8 *P. turionellae* zehir enjeksiyonu ve parazitlenmesinin konak *G. mellonella* pupunda mitotik indekse etkileri.

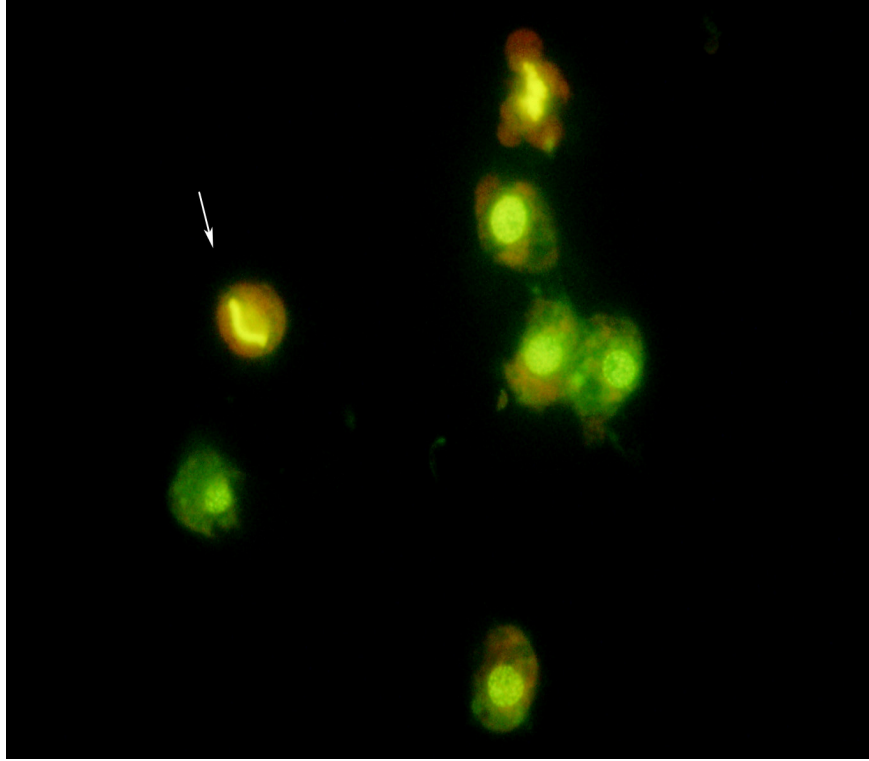
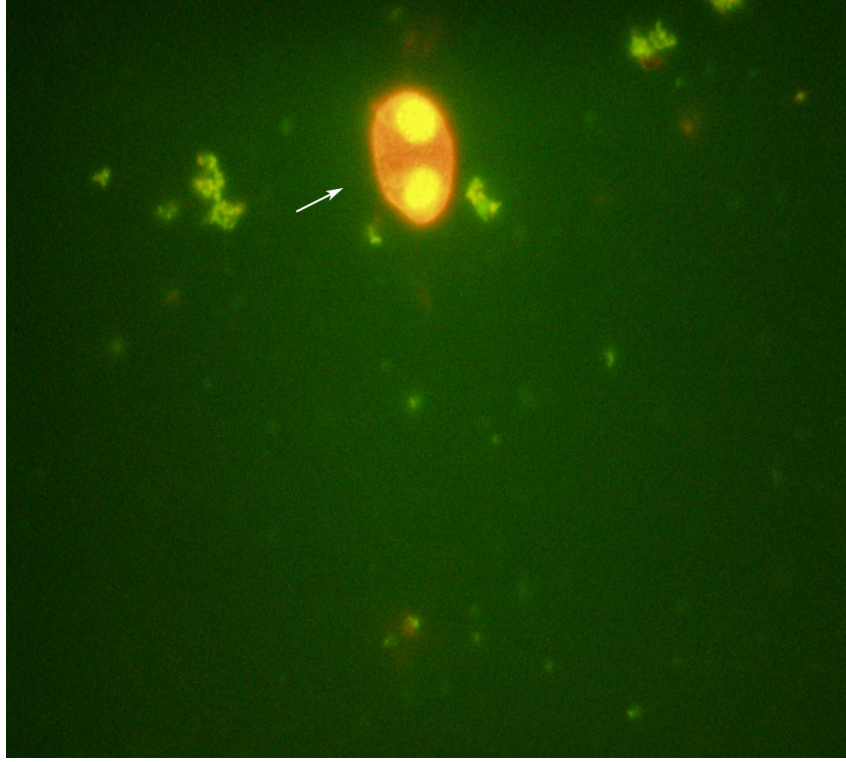
*P. turionellae* zehir enjeksiyonu ve parazitlenmesinin *G. mellonella* pupunda mitotik indekse etkilerinin belirlenebilmesi için enjeksiyonu ve parazitlenmeyi takiben 4, 8 ve 24 saat sonra hemolenf alınarak mitotik hemositlerin oranları üç tekrarlı deney serileri ile belirlendi. Pupal dönemde mitoz evresindeki hemositler Şekil 3.34'de görülmektedir. Tablo 3.17'de kontrol, boş enjeksiyon, PBS ve zehir enjeksiyonu yapılmış ve parazitlenmiş puplarda mitotik hemositlerin ortalama oranları verilmektedir. Hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupal hemositlerinde mitotik hücre oranları ortalamaları 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda sırasıyla %  $1,13 \pm 0,30$ , %  $1,40 \pm 0,40$  ve %  $1,80 \pm 0,52$  olarak belirlendi (Tablo 3.17).

**Tablo 3.17.** Parazitlenme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G. mellonella* pup evresinde mitoz evresindeki hücrelerin (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri.

Deney Grubu	Mitotik indeks (% $\pm$ SH)*		
	Zaman**		
	4 s	8 s	24 s
Kontrol Pup	$1,13 \pm 0,30$ a x	$1,40 \pm 0,40$ a x	$1,80 \pm 0,52$ a x
Boş Enjeksiyon	$1,00 \pm 0,72$ ab x	$0,87 \pm 0,30$ ab x	$1,67 \pm 0,80$ a x
PBS	$1,27 \pm 0,61$ a x	$1,20 \pm 0,20$ ab x	$0,93 \pm 0,50$ ab x
0,005 KEZ	$0,27 \pm 0,23$ bc x	$0,47 \pm 0,30$ abc x	$0,33 \pm 0,41$ ab x
0,01 KEZ	$0,13 \pm 0,23$ c x	$0,27 \pm 0,30$ d x	$0,33 \pm 0,30$ ab x
0,02 KEZ	$0,07 \pm 0,12$ c x	$0,13 \pm 0,12$ cd x	$0,67 \pm 0,61$ ab x
0,05 KEZ	$0,00 \pm 0,00$ c x	$0,00 \pm 0,00$ d x	$0,07 \pm 0,12$ b x
Parazitlenme	$0,00 \pm 0,00$ c x	$0,00 \pm 0,00$ d x	$0,00 \pm 0,00$ b x

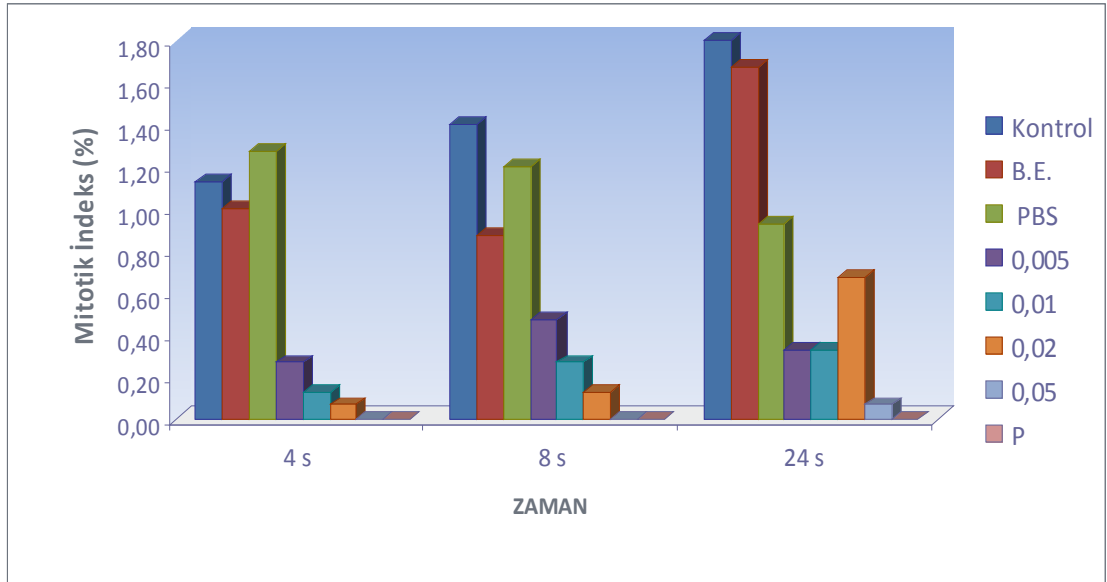
\*Deney grubu sonuçları üç tekrarın ortalamasını göstermektedir.

\*\* Aynı sütunda (a-d) ve satırda (x) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ( $P > 0,05$ ).



**Şekil 3.34.** *G. mellonella* pupal dönemde mitoz evresinde hemositler. Büyütme: 1000X.

Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış *G. mellonella* puplarında mitotik indeks hiçbir işleme tabi tutulmamış puplara benzerlik gösterdi (Tablo 3.17, Şekil 3.35). Tablo 3.17’de görüldüğü gibi parazitlenme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak konak puplarında mitoz bölünme geçiren hemositlerin oranlarında 4 (F= 10,755; sd= 7,16; P = 0,000), 8 (F= 15,873; sd= 7, 16; P = 0,000) ve 24 (F= 5,633; sd= 7,16; P = 0,002) saatlik dönemlerde azalmalar gözlemlendi. 0,005 KEZ dozu enjeksiyonunu takiben 4 saat sonra dolaşımdaki mitotik hemositlerin oranı hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol puplarına göre azalma gösterdi. 0,01 ve 0,02 KEZ dozlarında ise enjeksiyonu takiben 4 ve 8 saatlik dönemlerde mitotik indekste kontrol, boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonuna kıyasla azalmalar gözlenirken, 24 saatlik dönemde böyle bir etki gözlenmedi (Tablo 3.17, Şekil 3.35). En yüksek zehir dozu olan 0,05 KEZ dozu ve parazitlenmiş gruplarda tüm zaman dönemlerinde mitotik indekste meydana gelen azalmalar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. 0,05 KEZ dozunda 4 ve 8 saatlik dönemlerde hiçbir hemosit mitoz evresinde bulunmazken, parazitlenmiş gruplarda hiçbir zaman döneminde mitoz evresinde hemositlere rastlanmadı (Tablo 3.17, Şekil 3.35).



**Şekil 3.35.** Parazitlenme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G. mellonella* pupunda mitoz evresindeki hemositlerin oranları (%), Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitlenme.

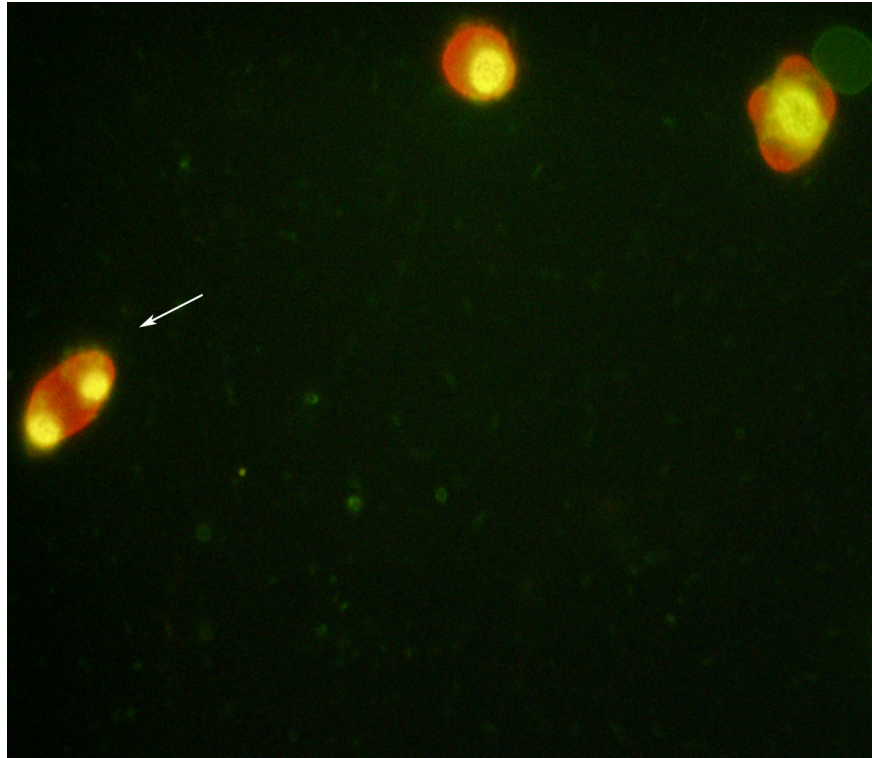
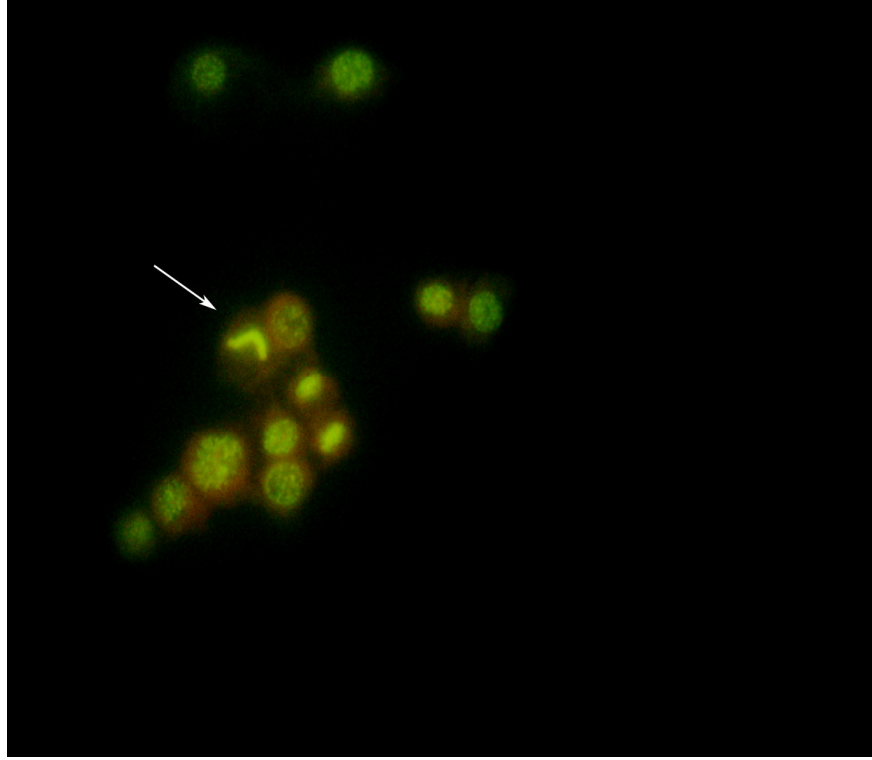
Çift yönlü ANOVA sonuçlarına göre konak *G. mellonella* pupu mitoz evresindeki hemosit oranlarına zehir enjeksiyonu ve parazitlemenin etkisi deney gruplarına bağlı (P=0,000) ancak zamana bağlı değildir (P=0,106). Deney ve kontrol grupları ile mitotik indeks arasındaki etkileşim zamandan etkilenmedi (P=0,796) (Tablo 3.18).

**Tablo 3.18.** Farklı deney grupları, zaman ve etkileşimlerinin *G. mellonella* pupunda mitotik indekse etkilerini gösteren ANOVA tablosu.

Evre	Kaynak	sd	KO	F	P	r <sup>2</sup>
Pup	Deney Grupları	7	0,020	25,201	0,000	0,799
	Zaman	2	0,002	2,352	0,106	
	Deney Grupları x Zaman	14	0,001	0,665	0,796	
	Hata	48	0,001			

### 3.9 *P. turionellae* zehir enjeksiyonunun konak *G. mellonella* larvasında mitotik indekse etkileri

*P. turionellae* zehir enjeksiyonunun *G. mellonella* larvasında mitotik indekse etkilerinin belirlenebilmesi için enjeksiyonu takiben 4, 8 ve 24 saat sonra hemolenf alınarak mitotik hemositlerin oranları üç tekrarlı deney serileri ile belirlendi. Larval dönemde mitoz evresindeki hemositler Şekil 3.36'da görülmektedir. Tablo 3.19'da normal, boş enjeksiyon, PBS ve zehir enjeksiyonu yapılmış larvalarda mitotik hemositlerin ortalama oranları verilmektedir. Hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* kontrol larvalarında dolaşımdaki mitotik hemositlerin oranları 4, 8 ve 24 saatlik periyotlarda sırasıyla %  $1,93 \pm 0,61$ , %  $2,40 \pm 0,60$  ve %  $2,13 \pm 0,70$  olarak bulundu (Tablo 3.19, Şekil 3.37). Boş enjeksiyon, PBS enjeksiyonu ve 0,02 KEZ enjeksiyonu yapılmış larvalarda hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol larvalarına kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Tablo 3.19). Zehir dozlarına bağlı olarak mitotik fazdaki hemositlerin oranı 4 (F=7,268; sd=6,14; P=0,001), 8 (F=22,981; sd =



**Şekil 3.36.** *G. mellonella* larval dönemde mitoz evresinde hemositler. Büyütme: 1000X.

6,14 ; P=0,000) ve 24 (F=4,776; sd=6,14; P=0,008) saatlik periyotlarda azalma eğilimi gösterdi (Tablo 3.19). 0,05 KEZ dozundan büyük dozlarda mitoz evresindeki hemositlerin oranında 4 ve 8 saatlik ve 0,5 KEZ dozunda 24 saatlik dönemde kontrol gruplarına göre azalma gözlemlendi.

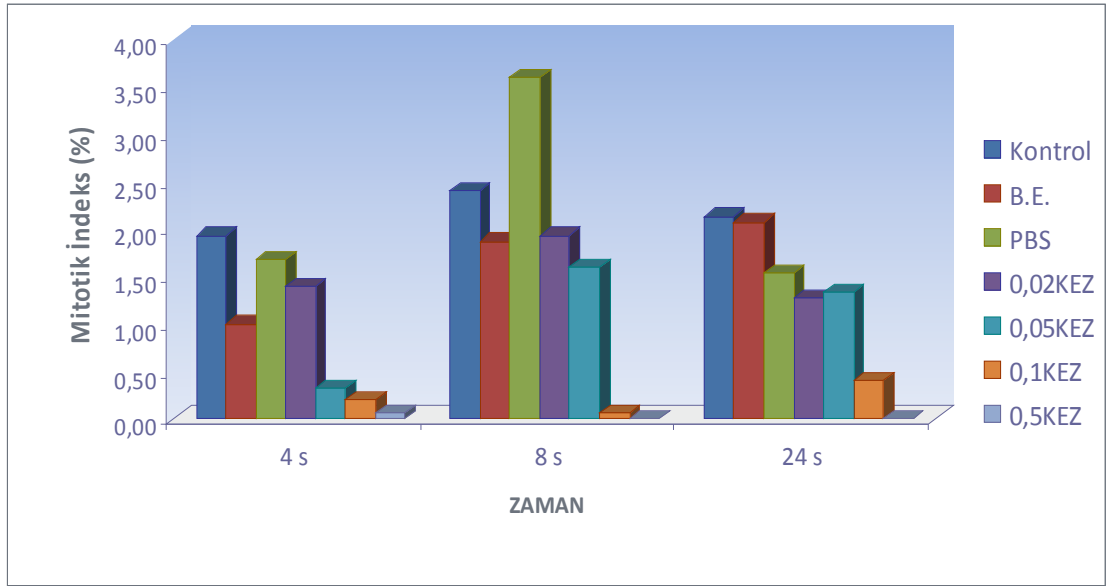
Çift yönlü ANOVA sonuçlarına göre konak *G. mellonella* larvası mitoz evresindeki hemosit oranlarına zehir enjeksiyonunun etkisi deney gruplarına (P=0,000) ve zamana bağlıydı (P=0,007). Deney ve kontrol grupları ile mitotik indeks arasındaki etkileşim zamandan etkilenmedi (P=0,122) (Tablo 3.20).

**Tablo 3.19.** Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde mitoz evresindeki hücrelerin (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri.

Deney Grubu	Mitotik indeks (% ± SH)*		
	Zaman**		
	4 s	8 s	24 s
Normal Larva	1,93 ± 0,61 a x	2,40 ± 0,60 a x	2,13 ± 0,70 a x
Boş Enjeksiyon	1,00 ± 0,91 abc x	1,87 ± 0,50 a x	2,07 ± 0,12 a x
PBS	1,67 ± 0,50 a x	3,60 ± 1,71 a x	1,53 ± 0,94a x
0,02 KEZ	1,40 ± 0,60 ab x	1,93 ± 0,12 a x	1,27 ± 1,13 ab x
0,05 KEZ	0,33 ± 0,31 bc x	1,60 ± 0,60 a x	1,33 ± 0,64 a x
0,1 KEZ	0,20 ± 0,20 c x	0,07 ± 0,12 b x	0,40 ± 0,69 ab x
0,5 KEZ	0,07 ± 0,12 c x	0,00 ± 0,00 b x	0,00 ± 0,00 b x

\*Deney grubu sonuçları üç tekrarın ortalamasını göstermektedir.

\*\* Aynı sütunda (a-c) ve satırda (x) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).



**Şekil 3.37.** *P. turionellae* zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G. mellonella* larvasında mitoz evresindeki hemositlerin oranları (%), Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.

**Tablo 3.20.** Farklı deney grupları, zaman ve etkileşimlerinin *G. mellonella* larvasında mitotik indekse etkilerini gösteren ANOVA tablosu.

Evre	Kaynak	sd	KO	F	P	r <sup>2</sup>
	Deney Grupları	6	7,012	15,532	0,000	
Larva	Zaman	2	2,550	5,650	0,007	0,747
	Deney Grupları x Zaman	12	0,732	1,621	0,122	
	Hata	42	0,451			

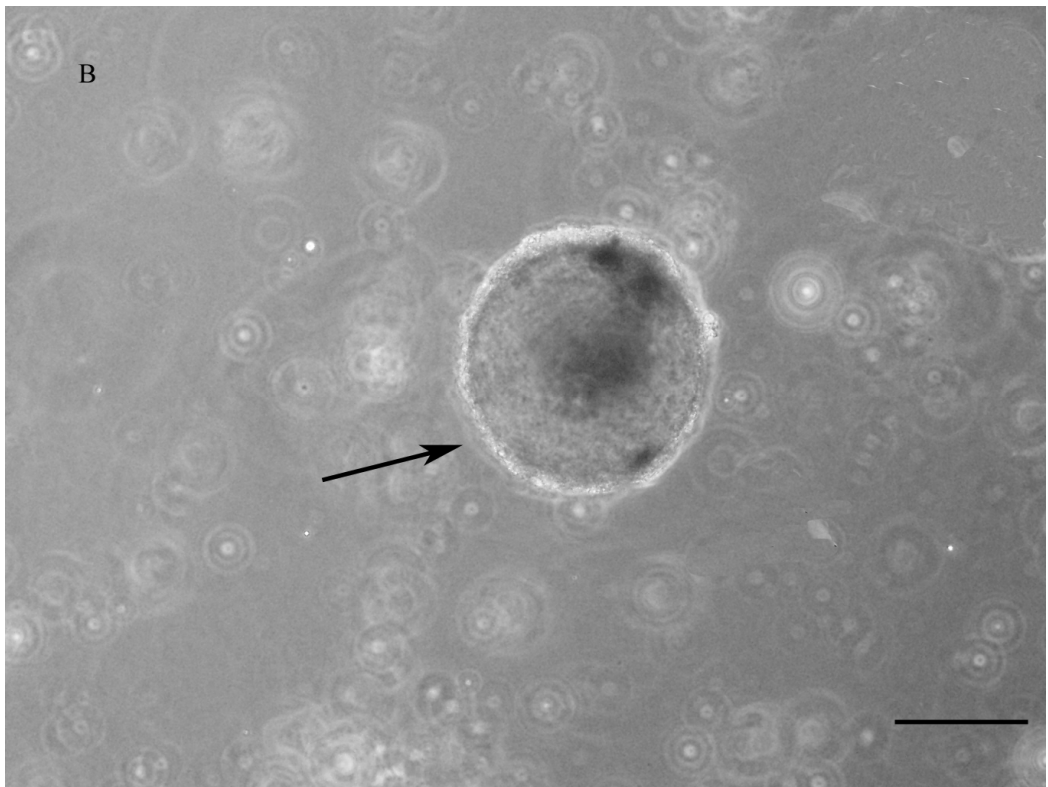
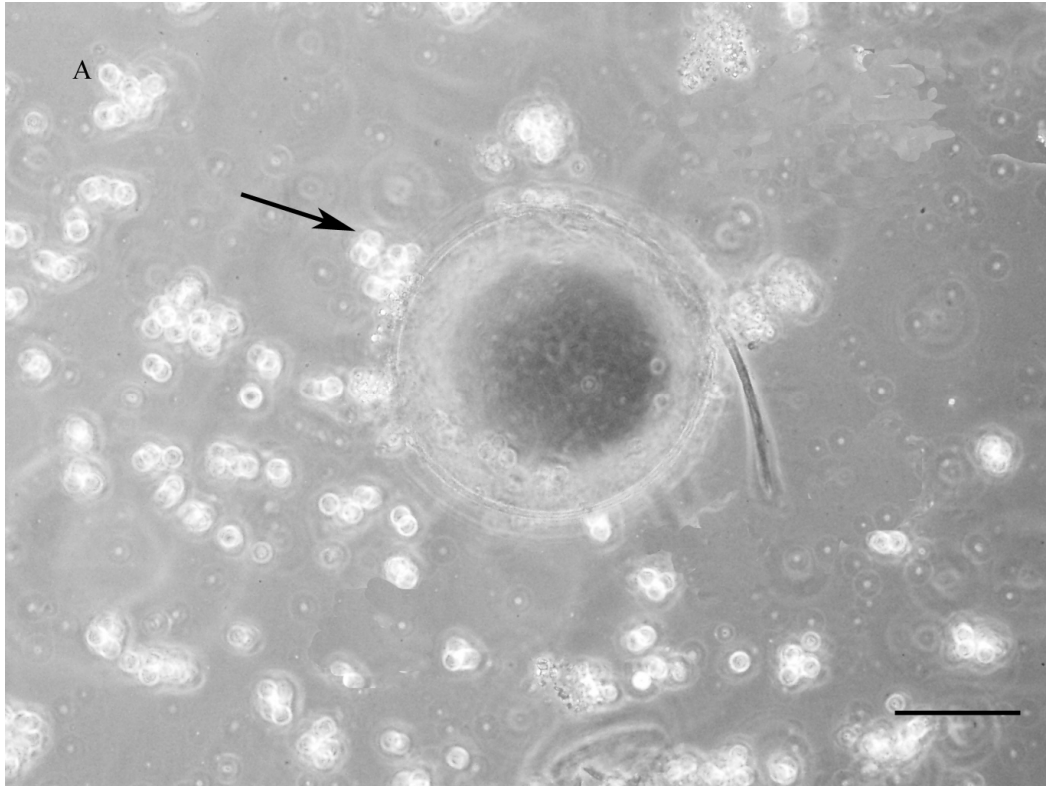
### 3.10. *P. turionellae* zehiri ve parazitlenmesinin konak *G. mellonella* pupal hemositlerinde in vivo enkapsülasyona etkileri

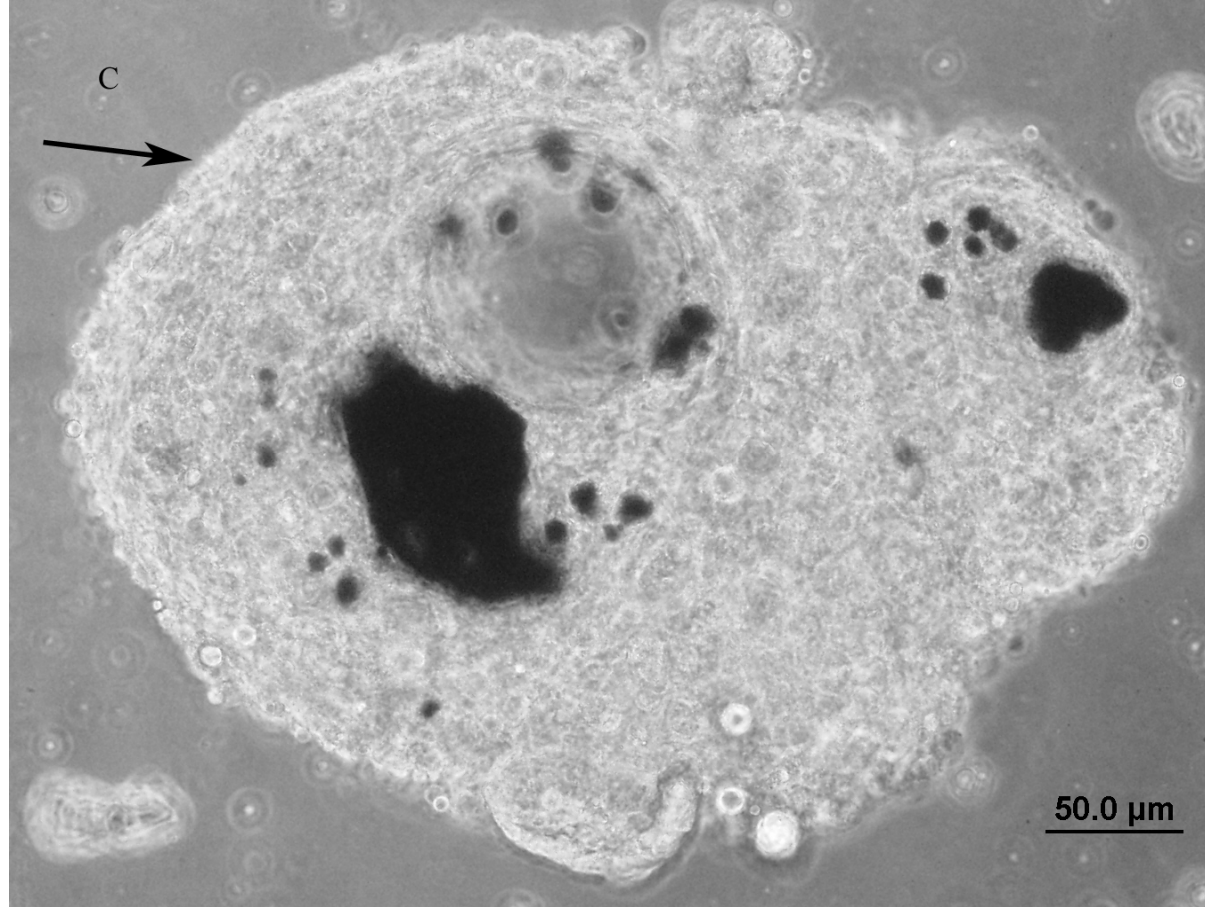
*G. mellonella* larva ve pupuna enjekte edilen Sephadex A-25 boncukları hem larval hem de pupal evrede güçlü bir enkapsülasyon tepkisi ortaya çıkardı ve enjeksiyonu takiben 4 ve 24 saatlik dönemlerde boncuklar etrafında oluşan kapsüllerin kalınlığı farklılık gösterdi. Böcek içerisinden çıkarılan boncuklar:



- Boncuk enkapsüle olmamış veya üzerinde birkaç hemosit var ise enkapsüle olmamış,
- Boncuk üzerinde 2-10 katman hemosit var ise zayıf enkapsüle olmuş,
- Boncuk üzerinde 10 ve daha fazla hemosit katmanı var ise güçlü enkapsüle olmuş

olarak üç farklı şekilde ele alındı (Şekil 3.38). Boncuklar etrafındaki enkapsülasyon materyali pupal evrede larval evreye kıyasla daha gevşek bir oluşum gösterdi. Tablo 3.21’de zehir enjeksiyonu ve parazitlemeye bağlı olarak *G. mellonella* pupal evrede enkapsüle olmamış, zayıf ve güçlü enkapsüle olmuş boncukların oranı görülmektedir. Buna göre hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupunda 4 saatlik dönemde enkapsüle olmamış, zayıf enkapsüle olmuş ve güçlü enkapsüle olmuş boncukların oranı sırasıyla %  $6,2 \pm 1,6$ , %  $83,6 \pm 3,4$  ve %  $10,2 \pm 3,8$  olarak hesaplandı (Tablo 3.21, Şekil 3.39). 24 saatlik dönemde ise özellikle güçlü enkapsüle olmuş boncuklarda büyük bir artış gözlemlendi ve bu oranlar sırasıyla %  $5,7 \pm 1,7$ , %  $45,7 \pm 5,1$  ve %  $48,6 \pm 5,3$  olarak bulundu. Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda enkapsülasyon oranları hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol puplarına benzerlik gösterdi (Tablo 3.21). 15 parazitlenmiş puptan enjeksiyonu takiben 24 saat sonra disekte edilen 155 boncuktan sadece 9 tanesi güçlü enkapsüle olurken 76 tanesi zayıf enkapsüle oldu ve geri kalan 70 boncuk tamamen enkapsülasyon materyalinden yoksundu (Tablo 3.21). Zehir enjeksiyonunu takiben 4 (F=12,705; sd= 7,112; P=0,000) ve 24 (F=17,808; sd= 7,112; P=0,000) saat sonra enkapsüle olmamış boncukların oranında artan zehir dozlarına bağlı olarak artış gözlemlendi. Enkapsüle olmamış boncukların oranı tüm zehir dozlarında hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* puplarına göre % 100’den fazla artış gösterdi. 0,05 KEZ dozu enjeksiyonu ve parazitlemeyi müteakip 24 saat sonra güçlü enkapsüle olmuş boncukların oranı sırasıyla %  $11,9 \pm 4,2$  ve %  $5,4 \pm 2,3$  olarak bulunurken bu oran kontrol pupunda %  $48,6 \pm 5,3$  olarak hesaplandı (Tablo 3.21). 0,05 KEZ dozu ve parazitlemeyi takiben 24 saat sonra güçlü enkapsülasyon oranındaki bu azalma kontrol grupları ve diğer zehir dozlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=15,498; sd=7,112; P=0,000).





**Şekil 3.38** *G. mellonella*'da A) Enkapsüle olmamış, B) Zayıf enkapsüle olmuş, C) Güçlü enkapsüle olmuş DEAE Sephadex A-25 Boncukları.

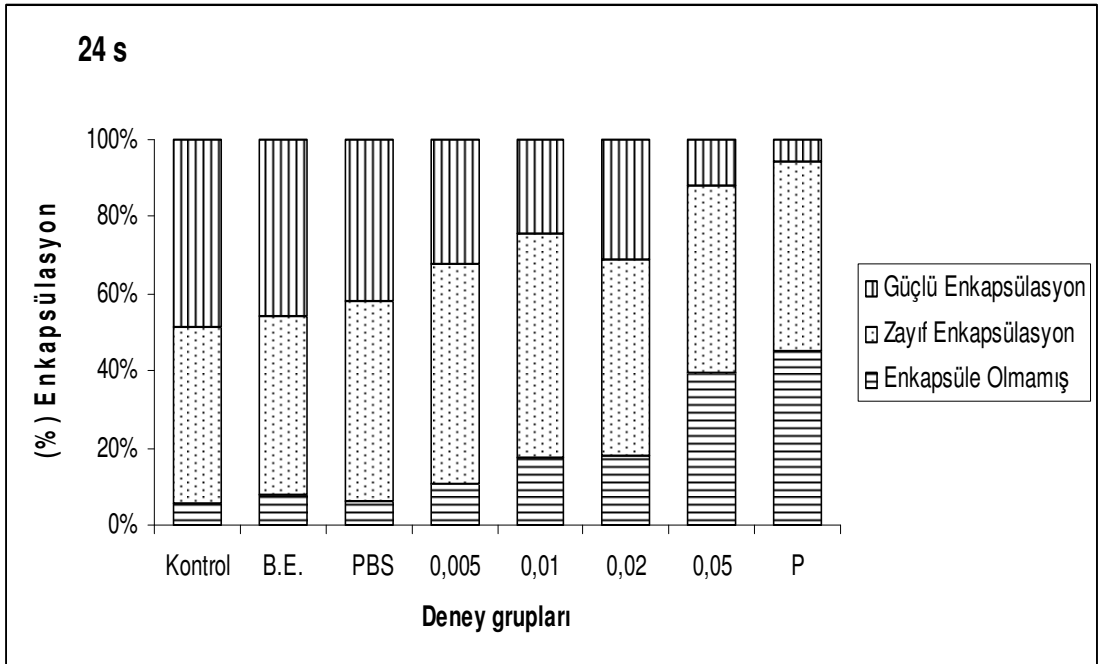
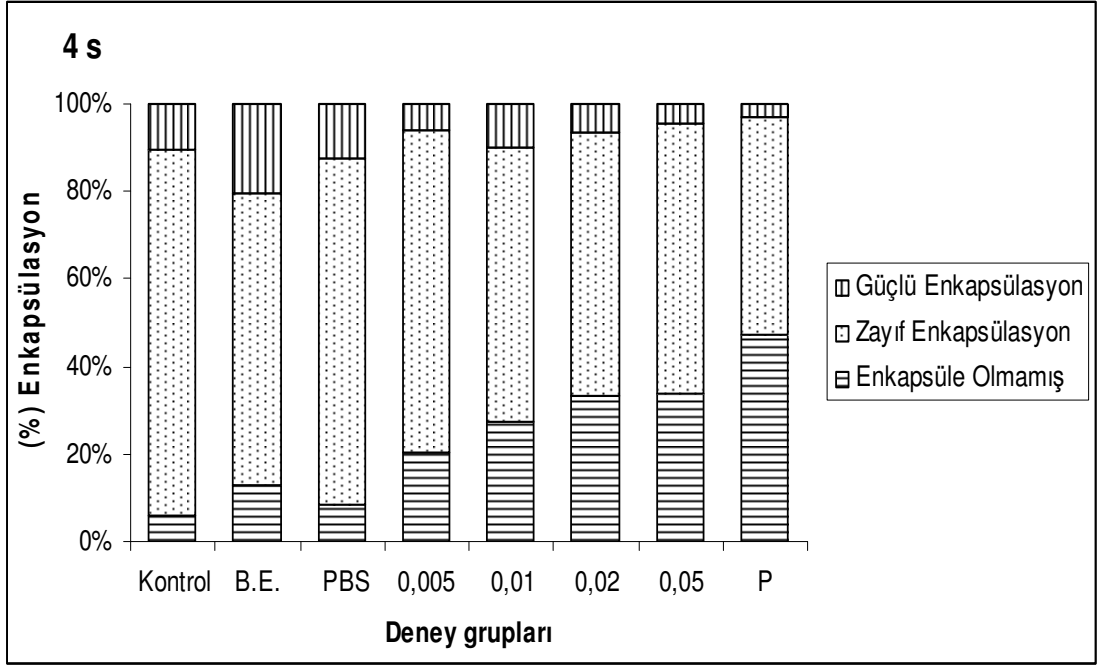
Siyah ok: Boncuk etrafındaki hemositler. Ölçü Barı: 50 μm.

**Tablo 3.21.** Parazitlenme ve zehir enjeksiyonuna bağı olarak *G.mellonella* pup evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağı değışimleri.

Deney Grupları <sup>#</sup>	Geri Alınan Boncuk Sayısı		Enkapsülasyon Derecesi (% ± SH ve ≠ boncuk sayısı)*					
	4 s	24 s	Enkapsüle olmamış		Zayıf		Güçlü	
			4 s	24 s	4 s	24 s	4 s	24 s
Kontrol	140	167	6,2 ± 1,6 a 9	5,7 ± 1,7 a 10	83,6 ± 3,4 a 118	45,7 ± 5,1 a 77	10,2 ± 3,8 ab 13	48,6 ± 5,3 a 80
Boş Enjeksiyon	168	155	12,9 ± 2,5 abc 22	7,9 ± 2,0 ab 12	66,7 ± 3,3 bcd 114	46,5 ± 3,4 a 71	20,4 ± 4,0 b 32	45,6 ± 4,3 a 72
PBS	156	161	8,3 ± 2,4 ab 13	6,4 ± 1,5 ab 11	79,4 ± 3,9 ab 123	52,0 ± 5,0 a 82	12,3 ± 3,9 ab 20	41,6 ± 5,2 ab 68
0,005 KEZ	150	159	20,4 ± 2,8 bcd 31	10,9 ± 2,6 ab 17	73,5 ± 2,8 abc 111	56,7 ± 2,7 a 90	6,1 ± 2,6 a 8	32,4 ± 3,4 ab 52
0,01 KEZ	143	165	27,4 ± 5,5 cd 37	17,3 ± 3,4 b 28	62,8 ± 5,0 cd 93	58,6 ± 3,3 a 97	9,8 ± 3,2 ab 13	24,1 ± 3,5 b 40
0,02 KEZ	166	164	33,2 ± 3,8 de 57	17,8 ± 2,2 b 28	60,3 ± 3,2 cd 99	51,2 ± 5,0 a 84	6,5 ± 2,3 ab 10	31,0 ± 5,5 ab 52
0,05 KEZ	165	152	33,7 ± 3,7 de 56	39,4 ± 4,7 c 61	61,8 ± 4,1 cd 102	48,7 ± 5,5 a 76	4,5 ± 1,8 ab 7	11,9 ± 4,2 c 15
Parazitlenme	161	155	47,1 ± 6,1 e 77	45,3 ± 4,8 c 70	49,8 ± 5,6 d 79	49,3 ± 4,0 a 76	3,1 ± 2,2 a 5	5,4 ± 2,3 c 9

<sup>#</sup>Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

\* Aynı sütunda (a-e) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05)



**Şekil 3.39.** Parazitleme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G. mellonella* pup evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri, 4 s: 4 saat, 8 s: 8 saat, Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitleme.

### 3.11. *P. turionellae* zehir enjeksiyonunun konak *G. mellonella* larval hemositlerinde in vivo enkapsülasyona etkileri

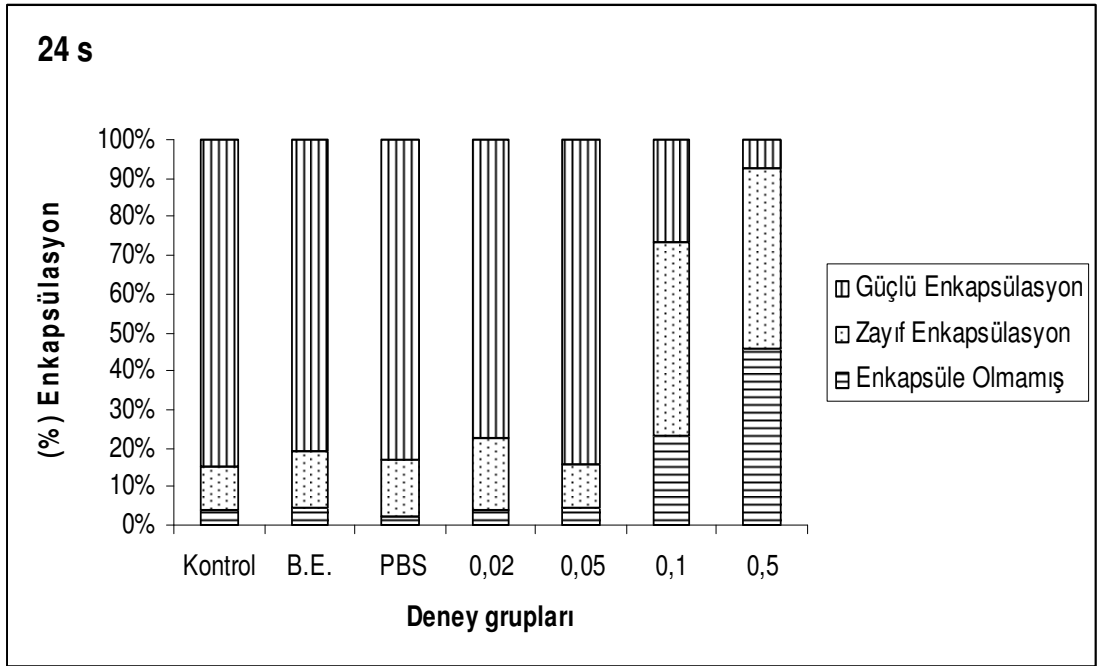
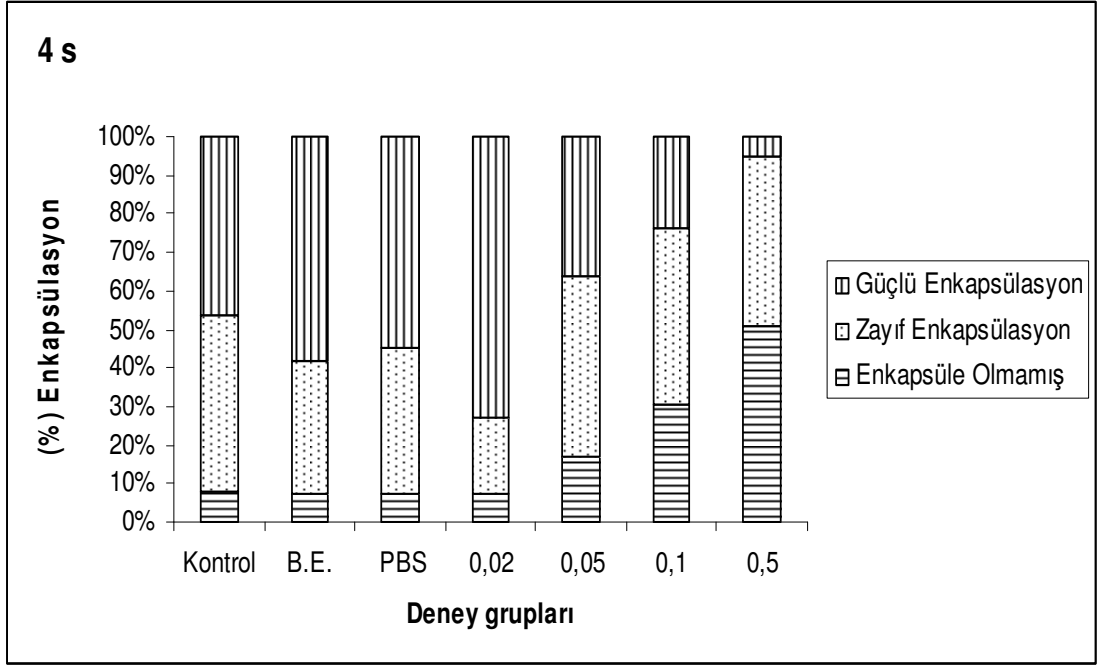
*P. turionellae* zehir enjeksiyonuna bağı olarak konak *G. mellonella* hemositleri enkapsülasyon tepkilerinde görülen değişimler Tablo 3.22'de görülmektedir. Sephadex A-25 boncuklarının hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvalarına enjeksiyonunu takiben 4 ve 24 saat sonra geri alınan boncukların % 46,3 ± 4,3 ve % 84,9 ± 3,7' si güçlü enkapsüle oldu (Tablo 3.22, Şekil 3.40). Bu durum hücrel savunma reaksiyonlarının *G. mellonella*'da pupal evreye kıyasla larval evrede daha hızlı oluştuğunu göstermektedir. Boş enjeksiyon yapılmış ve PBS enjekte edilmiş konak larvalarına Sephadex A-25 boncuklarının enjeksiyonunu takiben 4 ve 24 saatlik dönemlerde enkapsüle olmamış, zayıf enkapsüle olmuş ve güçlü enkapsüle olmuş boncukların oranı hiçbir işleme tabi tutulmamış larvalara benzerlik gösterdi (Tablo 3.22, Şekil 3.40). 0,02 ve 0,05 KEZ dozları enjeksiyonunu takiben 4 ve 24 saatlik periyotlarda enkapsüle olmamış ve güçlü enkapsüle olmuş boncukların oranında kontrol larvalarına göre anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 3.22). 0,05 dozundan daha yüksek dozlarda ilk 4 saatlik periyotta enkapsüle olmamış (F=14,873; sd=6,98; P=0,000) ve güçlü enkapsüle olmuş (F=24,149; sd=6,98; P=0,000) boncukların oranında zehir enjeksiyonuna bağı olarak istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler oldu (Tablo 3.22). Benzer şekilde 0,05 KEZ dozundan daha büyük dozlarda enjeksiyonu takiben 24 saatlik dönemde enkapsüle olmamış (F=27,146; sd=6,98; P=0,000), zayıf enkapsüle olmuş (F=12,423; sd=6,98; P=0,000) ve güçlü enkapsüle olmuş (F=42,304; sd=6,98; P=0,000) boncukların oranında önemli farklılıklar gözlemlendi (Tablo 3.22). 0,1 KEZ dozu enjeksiyonunu müteakip 4 ve 24 saatlik dönemlerde enkapsüle olmamış boncukların oranı sırasıyla % 30,6 ± 5,8 ve % 23,0 ± 4,0, güçlü enkapsüle olmuş boncukların oranı ise sırasıyla % 23,5 ± 4,2 ve % 26,6 ± 3,7 olarak hesaplandı ve kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 3.22). En yüksek zehir dozu olan 0,5 KEZ dozu enjeksiyonunu takiben 4 ve 24 saat sonra enkapsüle olmamış boncukların oranı sırasıyla % 51,1 ± 6,9 ve % 45,6 ± 5,5 olarak hesaplandı (Tablo 3.22).

**Tablo 3.22.** *P. turionellae* zehir enjeksiyonuna bağılı olarak *G. mellonella* larva evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağılı değişimleri.

Deney Grupları <sup>#</sup>	Geri Alınan Boncuk Sayısı		Enkapsülasyon Derecesi (% ± SH ve ≠ boncuk sayısı)*					
	4 s	24 s	Enkapsüle olmamış		Zayıf		Güçlü	
			4 s	24 s	4 s	24 s	4 s	24 s
Kontrol	160	167	7,9 ± 2,2 a 13	4,0 ± 1,6 a 7	45,8 ± 4,4 a 74	11,1 ± 2,7 a 18	46,3 ± 4,3 b 73	84,9 ± 3,7 a 142
Boş Enjeksiyon	167	174	7,1 ± 1,8 a 12	4,8 ± 1,6 a 8	34,9 ± 3,9 ab 57	14,5 ± 3,0 a 26	58,0 ± 4,1 ab 98	80,7 ± 4,2 a 140
PBS	164	162	7,4 ± 1,9 a 12	2,2 ± 1,2 a 3	37,8 ± 7,1 ab 65	14,6 ± 3,7 a 24	54,8 ± 6,9 b 87	83,2 ± 3,7 a 135
0,02 KEZ	165	160	7,1 ± 2,9 a 12	4,0 ± 1,4 a 7	20,3 ± 4,0 b 34	18,5 ± 4,9 a 29	72,6 ± 5,6 a 119	77,5 ± 4,9 a 124
0,05 KEZ	165	158	17,1 ± 3,8 ab 28	4,5 ± 2,0 a 7	46,7 ± 5,7 a 76	11,4 ± 3,4 a 19	36,2 ± 5,2 bc 61	84,1 ± 3,7 a 132
0,1 KEZ	156	170	30,6 ± 5,8 b 44	23,0 ± 4,0 b 38	45,9 ± 5,4 a 72	50,4 ± 5,2 b 87	23,5 ± 4,2 c 40	26,6 ± 3,7 b 45
0,5 KEZ	141	157	51,1 ± 6,9 c 72	45,6 ± 5,5 c 71	43,9 ± 6,2) a 61	47,0 ± 5,0 b 74	5,0 ± 2,0 d 8	7,4 ± 2,7 c 12

<sup>#</sup>Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

\* Aynı sütunda (a-d) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05)



**Şekil 3.40.** Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde enkapsülasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri, 4 s: 4 saat, 8 s: 8 saat, Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.



### 3.12. *P. turionellae* zehir enjeksiyonu ve parazitlenmesinin konak *G. mellonella* pupal hemositlerinde in vivo melanizasyona etkileri

*P. turionellae* zehir enjeksiyonu ve parazitlenmesine bağılı olarak konak *G. mellonella* pupu vücut boşluğunda bulunan Sephadex A-25 boncuklarının melanizasyon oranları Tablo 3.23’de verilmektedir. Hiçbir işleme tabi tutulmamış puplarda enjeksiyonu takiben 4 saat sonra boncukların % 11,3 ± 2,5’i melanize olurken 24 saat sonra bu oran 55,0 ± 3,7’ye yükseldi ve zaman dönemleri arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 3.23). Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda melanizasyon oranları 24 saatlik dönemde hiçbir işleme tabi tutulmamış puplara benzerlik gösterdi (Tablo 3.23, Şekil 3.41). Enjeksiyonu takiben 4 (F=4,07; sd=7,112; P<0,05) saatlik dönemde ise boş enjeksiyon yapılmış puplarda melanizasyon oranlarında artış gözlemlendi. Boncukların

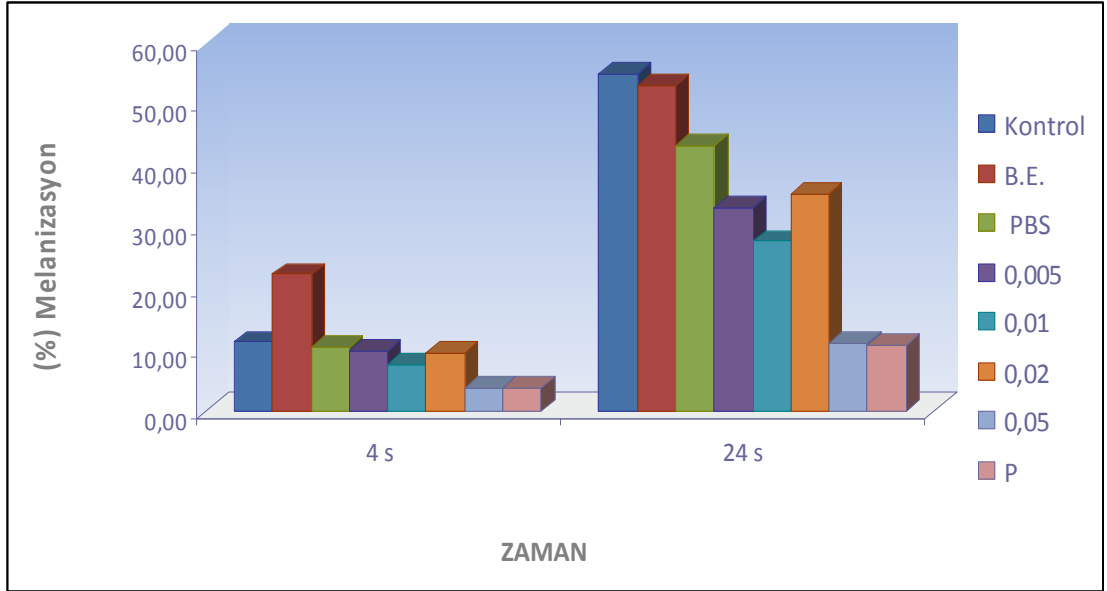
**Tablo 3.23.** Parazitlenme ve zehir enjeksiyonuna bağılı olarak *G. mellonella* pup evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağılı değışimleri.

Deney grupları <sup>#</sup>	Melanizasyon (%)*	
	Zaman	
	4 s	24 s
Kontrol	11,3 ± 2,5 ab x	55,0 ± 3,7 a y
Boş Enjeksiyon	22,2 ± 3,6 b x	53,0 ± 3,1 a y
PBS	10,5 ± 2,2 ab x	43,2 ± 4,4 ab y
0,005	9,8 ± 2,8 ab x	33,1 ± 3,4 b y
0,01	7,6 ± 2,2 a x	27,6 ± 3,0 b y
0,02	9,5 ± 2,4 ab x	35,4 ± 4,5 ab y
0,05	3,9 ± 1,3 a x	11,1 ± 2,6 c x
Parazitlenme	3,9 ± 1,6 a x	10,7 ± 3,4 c x

<sup>#</sup>Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

\* Aynı sütunda (a-c) ve satırda (x-y) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).

melanizasyon oranları 0,05 KEZ ve parazitlenmiş gruplar hariç diğer tüm deney serilerinde 4 ve 24 saatlik dönemlerde farklılık gösterdi (Tablo 3.23). 0,02 KEZ dozu hariç diğer tüm zehir dozlarında ve parazitlenmiş gruplarda 24 saatlik dönemde melanizasyon oranlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı azalmalar oldu (F=23,07; sd=7,112; P<0,05). 0,05 KEZ dozu enjeksiyonu ve parazitlemeyi takiben 24 saat sonra melanizasyon oranları sırasıyla  $11,1 \pm 2,6$  ve  $10,7 \pm 3,4$  olarak tespit edildi (Tablo 3.23). 0,05 KEZ ve parazitlemeye bağlı olarak ortaya çıkan bu azalmalar hem kontrol gruplarına hem de daha düşük zehir dozlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 3.23).



**Şekil 3.41.** Parazitlenme ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G. mellonella* pup evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri, 4 s: 4 saat, 8 s: 8 saat, Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupu, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu, P: Parazitlenme.

### 3.13. *P. turionellae* zehir enjeksiyonunun konak *G. mellonella* larval hemositlerinde in vivo melanizasyona etkileri

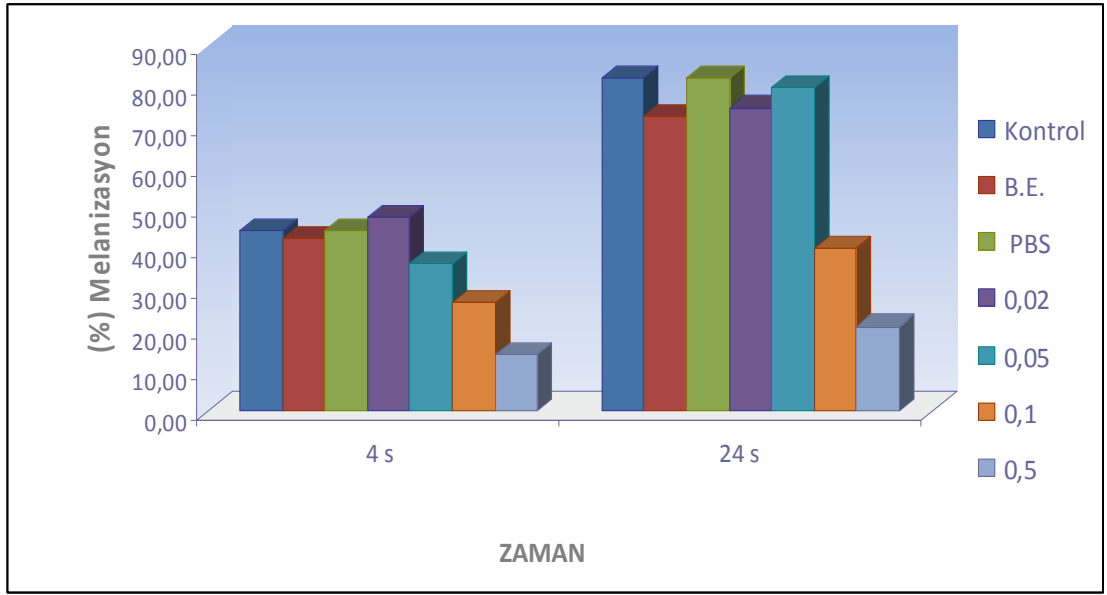
*P. turionellae* zehir enjeksiyonuna bağı olarak konak *G. mellonella* larvası vücut boşluğunda bulunan Sephadex A-25 boncuklarının melanizasyon oranları Tablo 3.24’de verilmektedir. Buna göre boncukların melanizasyon oranları kontrol grupları ve 0,5 KEZ dozu hariç diğer tüm deney serilerinde 24 saatlik dönemde 4 saatlik döneme kıyasla önemli farklılıklar gösterdi (Tablo 3.24, Şekil 3.42). Hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvalarında 4 ve 24 saatlik periyotlarda melanize olmuş kapsüllerin oranı sırasıyla % 44,6 ± 4,1 ve % 82,3 ± 3,1 olarak hesaplandı (Tablo 3.24, Şekil 3.42). Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda melanizasyon oranları hiçbir işleme tabi tutulmamış larvalara benzerlik gösterdi. Zehir enjeksiyonunu takiben ilk 4 saatlik dönemde en yüksek zehir dozu olan 0,5 KEZ dozu hariç diğer zehir dozları melanizasyon oranında anlamlı farklılık

**Tablo 3.24.** Zehir enjeksiyonuna bağı olarak *G. mellonella* larva evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağı değışimleri.

Deney grupları <sup>#</sup>	Melanizasyon (%)*	
	Zaman	
	4 s	24 s
Kontrol	44,6 ± 4,1 ab x	82,3 ± 3,1 a y
Boş Enjeksiyon	42,5 ± 3,2 ab x	72,6 ± 3,9 a y
PBS	44,5 ± 5,6 ab x	82,4 ± 3,5 a y
0,02	48,0 ± 4,9 a x	74,8 ± 3,6 a y
0,05	36,6 ± 2,4 ab x	79,8 ± 2,3 a y
0,1	26,9 ± 3,4 bc x	40,4 ± 3,5 b y
0,5	13,8 ± 3,1 c x	20,9 ± 3,4 c x

<sup>#</sup>Deney grubu sonuçları 3 tekrarın ortalamasını göstermektedir.

\* Aynı sütunda (a-c) ve satırda (x-y) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0,05).



**Şekil 3.42.** Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *G. mellonella* larva evresinde melanizasyon (%) oranları ve zamana bağlı değişimleri, 4 s: 4 saat, 8 s: 8 saat, Kontrol: Herhangi bir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* larvası, B.E: Boş Enjeksiyon, PBS: PBS Enjeksiyonu.

oluşturmadı (Tablo 3.24). 0,5 KEZ dozu enjeksiyonunu takiben 4 (F= 10,19; sd= 6, 98; P<0,05) saatlik dönemde 0,1 ve 0,5 KEZ dozları enjeksiyonunu müteakip 24 (F= 30,13; sd= 6, 98; P<0,05) saatlik dönemde melanizasyon oranlarında kontrol grupları ve düşük zehir dozlarına göre istatistiksel olarak önemli azalmalar gözlemlendi. En yüksek zehir dozu olan 0,5 KEZ dozunda 4 ve 24 saatlik periyotlarda melanizasyon oranları sırasıyla % 13,8 ± 3,1 ve % 20,9 ± 3,4 olarak hesaplandı (Tablo 3.24).

#### 4. TARTIŞMA

Hymenoptera takımının büyük bir kısmını oluşturan parazitoit arılar, zararlı böcek populasyonlarının kontrolünde önemli rol oynarlar. Zararlı böcek türlerinin parazitoitlerle biyolojik mücadelesinde konak-parazitoit ilişkisinin bilinmesi yapılacak mücadelenin başarısı için önemli bir unsurdur. Parazitoit türler gelişimleri için uygun ortam sağlamak amacıyla genellikle konakları olan böceklerin zararına olacak şekilde, konak bağışıklık, hormonal, gelişim ve metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesini içeren çeşitli mekanizmalara sahiptirler [22]. Konak regülasyonu olarak adlandırılan bu mekanizmalar içinde [234] önemli bir basamak olan konak bağışıklık sisteminden kaçınma; immünolojik olarak tanınmayı engelleme veya konağın hemositik enkapsülasyon reaksiyonlarını baskılama şeklinde ortaya çıkmaktadır [55]. Biyolojik mücadelede doğal bir kaynak oluşturan Hymenopter türlerinin parazitlenme öncesi veya esnasında konaklarına aktardıkları salgıların ve bu salgıların konak bağışıklık sistemi ve öğeleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ile gelecekte bu zararlı türlere özgü biyolojik insektisitlerin üretimi mümkün olabilecektir.

Böceklerde bağışıklık sisteminin önemli bir unsuru olan hücresel bağışıklık tepkileri hemolenfte bulunan hemositler tarafından gerçekleştirilir. *G. mellonella* hemosit tiplerinin belirlendiği bir çalışmada, larval evrede temel hemosit tiplerinin prohemositler, plazmatositler, adipohemositler, sferül hücreler ve önositoidler olduğu belirlenmiştir [118]. Jones (1967) ise prohemositler ve plazmatositlerin ayrımı çok zor olduğu için her iki hücre grubunu tek bir kategoriye alarak plazmatositoit terimini kullanmıştır [119]. Neuwirth (1973) *G. mellonella*'da daha önceki çalışmalarda yağ damlaları içerdiği için adipohemosit olarak adlandırılan hemosit tiplerinin aslında granüler hemositler olduğunu ve pup evresine yaklaştıkça bu yağ damlalarının genişleyerek sayılarının arttığını belirtmiştir [120]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel karakterlerine göre Lepidopterlerdeki temel hemosit tipleri prohemositler, granüositler, plazmatositler,

sferülositler ve önositoidler olarak belirlenmiştir [36, 52, 100]. Çalışmamızda, preperatların mikroskopik incelemesi sonucunda, yapılan diğer çalışmaların sonuçlarına uygun olarak *G. mellonella* larva hemolenfinde mevcut olan hemosit tipleri prohemositler, plazmatositler, granülositler, sferülositler ve önositoidler olarak belirlendi. Pup hemolenfinde ise prohemositler, plazmatositler, granülositler ve sferülositler temel hemosit tipleri olarak belirlendi ancak incelenen hiçbir pup preperatında önositoidlere rastlanmadı. Literatürde *G. mellonella*'da pupal evrede önositoidlerin kaybolması ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamakla beraber, pupal evreye yaklaştıkça önositoidlerin sayılarının azaldığı bildirilmiştir [119]. Lepidopterlerde larval evrede farklı hemosit tipleri profili, *E. declarata* [235], *B. mori* [236] ve *P. includens* [126]'de ayrıntılı olarak araştırılmış ve son larval evrede önositoidlerin tespit edilemediği bildirilmiş ancak söz konusu böcek türleriyle ilgili pupal evrede bir çalışmaya rastlanmamıştır. *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Lepidoptera: Noctuidae)'da metamorfoz esnasında hemosit popülasyonları üzerinde yapılan bir çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde pupal evrede önositoidler görülmemiştir [237]. Farklı gelişim dönemlerinde *M. sexta* hemosit tipleri ve sayılarının belirlendiği başka bir çalışmada larval evrede mevcut olan önositoidler pupal evrede kaybolmuşlardır [238]. Araştırmacılar *M. sexta* hemosit profilinde meydana gelen bu değişimin özellikle ekdizon olmak üzere değişen böcek hormonu seviyelerinden kaynaklanabileceğini savunsalar da [238] bu konuda ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Daha önceki çalışmalarla, geniş bir konak yelpazesine sahip olması ile tutarlı olarak [195] *P. turionellae* dişilerinin zehir kesesi içeriğinin doğal konaklarının farklı evreleri üzerinde felç edici ve toksik etkileri olduğu, iki böcek takımına ait kültüre alınan hücrelerde *in vitro* sitotoksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir [228]. Zehirin etki mekanizmasının başlangıç safhalarının zehire duyarlı hücrelerde hücre zarı geçirgenliğindeki değişiklik sonucunda sitoplazmik uzantıların oluşması, hücrelerin yuvarlaklaşarak ve sonunda şişerek apoptozise benzer bir mekanizma ile parçalanması olduğu öne sürülmüştür [239]. Tez kapsamındaki çalışmalarda ise *P. turionellae* tarafından doğal olarak parazitlenen veya dişi parazitoitin zehir kesesi içeriğinin farklı dozlarının deneysel olarak konağa enjekte edilmesi ile konak hemolenfindeki toplam ve farklı hemositlerin miktarındaki değişimler araştırıldı. *P.*

*turionellae* tarafından parazitlenme ve zehir enjeksiyonu *G. mellonella* farklı gelişim evrelerinde dolaşımdaki hemosit sayılarında farklı etkiler gösterdi. Doz ve zamana bakılmaksızın parazitlenmiş ve zehir enjekte edilmiş puplarda toplam hemosit sayıları kontrol grubuna göre % 50'den fazla azaldı (Tablo 3.1, Şekil 3.9). Parazitlenmiş ve zehir enjekte edilmiş gruplarda tüm saatlerde *G. mellonella* toplam hemosit sayıları  $3-5 \times 10^6$  hücre/ml seviyelerine düşerken hiçbir işleme tabi tutulmamış puplarda hemosit sayıları  $10 \times 10^6$  hücre/ml'den fazla bulundu (Tablo 3.1, Şekil 3.9). Zıt olarak larvada toplam hemosit sayılarında sadece yüksek zehir dozlarında (0,1 ve 0,5 KEZ) anlamlı azalmalar gözlemlendi (Tablo 3.3, Şekil 3.10). *P. turionellae* dişilerinin ovipozisyon davranışı için *G. mellonella* pupunu larvaya tercih ettiği daha önceki çalışmada belirtilmiştir [195]. Düşük KEZ dozlarının hemosit sayılarında pupal evrede larvaya göre daha etkili olması *P. turionellae* dişilerinin pupal evreyi tercih etmesinin nedeni olabilir. Hymenoptera türlerinin zehirlerinin avları üzerinde etkili olabilmesi için üretilen zehirin miktarı ve kimyasal bileşiminin yanı sıra, bir seferde avlarına enjekte edilen zehir miktarının da önemli olduğu gösterilmiştir [240]. Yapılan çalışmaların sonuçları, parazitlenmede zehirin fonksiyonunun farklı konak türleri üzerinde farklı etkiler gösterdiğini, aynı zamanda doza bağlı farklılıkların da meydana geldiğini ortaya koymuştur [23, 147, 163, 164, 241 - 244]. Parazitoit zehirinin yol açtığı fizyolojik etkiler, konak türe olduğu kadar konak türün gelişme evresine bağlı olarak da değişmektedir [23, 163, 241, 243]. Bazı parazitoitlerin zehirleri konağı felç edebilmekte veya öldürebilmekte iken, diğer bazılarınınki büyüme ve gelişmeyi durdurur veya yavaşlatabilirler. Enjekte edilen zehirin doza bağlı etkisi de hem konak türe hem de konak türün evrelerine göre değişiklik göstermektedir [23, 241, 243]. Bununla beraber *P. turionellae* zehirinin *G. mellonella* pupu gibi larvasında da toksik etkileri olduğu [228] ve *G. mellonella* farklı gelişim evrelerinin *P. turionellae* tarafından parazitlenmeye karşı pup ile eşit olmasa da duyarlılık gösterdiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [195].

Parazitlenme, parazitoit zehirinin ve bununla beraber üreme sistemi salgılarının konak içerisine girmesini içermektedir ve bu esnada böcek vücut duvarının zarar görmesi hücrel faktörlerin değişmesine neden olabilir. Bu nedenle boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonunun *G. mellonella* hemosit sayılarına etkileri de belirlendi. Zehir enjeksiyonu ve parazitlenmenin aksine 24'üncü saatte boş enjeksiyon yapılmış

puplarda toplam hemosit sayıları hiçbir işleme tabi tutulmamış puplara daha fazla benzerlik gösterdi (Tablo 3.1, Şekil 3.9). Ancak, 4 ve 8 saat sonunda yapılan hemosit sayımları bu kontrol grubu için parazitlenen ve zehir enjeksiyonu yapılan deney gruplarından farklılık göstermedi. Diğer yandan, sadece PBS enjeksiyonu yapılan kontrol gruplarında da özellikle 4 ve 8'inci saatler sonunda yapılan sayımlarda hemosit sayısının parazitlenen ve zehir enjekte edilenlerin hemosit sayısından farklı olmadığı tespit edildi (Tablo 3.1, Şekil 3.9). Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılan puplardaki hemosit sayısındaki bu azalmanın yaralanma veya sıvı enjeksiyonunun sonucu meydana gelebileceği ve konağın beslenme ve hareket aktivitesi olmayan bu evresinin yaranın iyileştirilmesine veya sıvı enjeksiyonu sonucu oluşan ozmotik basınca geç tepkisinden kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir.

*P. turionellae* farklı kese eşdeğeri zehir dozları, konak *G. mellonella* son evre larvası toplam hemosit sayılarında deney ve kontrol grupları arasında 0,1 ve 0,5 KEZ dozlarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden oldu (Tablo 3.3, Şekil 3.10). 0,1 KEZ dozunda 24'üncü saatte, 0,5 KEZ dozunda ise 8 ve 24'üncü saatlerde hemosit sayıları her üç kontrol grubuna göre oldukça düşük bulundu (Tablo 3.3, Şekil 3.10). Boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda ise toplam hemosit sayıları pupal evrenin tam aksine tüm zaman dilimlerinde hiçbir işleme tabi tutulmamış larvaya ve düşük zehir dozlarına (0,02 ve 0,05 KEZ) benzerlik gösterdi (Tablo 3.3, Şekil 3.10). Farklı bir çalışmada *P. hypochondriaca* zehir enjeksiyonu ve PBS enjeksiyonunu takiben ilk 16 saate kadar tüm deney gruplarında konak tür *L. oleracea* larvaları toplam hemosit sayılarında anlamlı bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir [39].

Birçok araştırmacı başarılı bir parazitlemenin Lepidopter konaklarda toplam hemosit sayısında azalamaya yol açtığı sonucuna ulaşmıştır [178, 180, 181]. Ayrıca araştırmacılar hemosit sayısındaki azalma ve hemositlerin gördüğü zarardaki artışı deneysel olarak parazitoit zehiri enjekte edilen konaklarda da gözlemlemişlerdir [36, 178, 179]. Mochiah ve arkadaşları [180] konak *B. fusca*'da toplam hemosit sayılarının ve plazmatosit sayılarının parazitoit *C. sesamiae* parazitlenmesi sonucu azaldığını belirtmişler ve zehir salgısının bu immün baskılamada tek başına yeterli



olmadığını savunmuşlardır. Parazitoit *C. plutellae* parazitlemesine bağlı olarak konak *P. xylostella*'da toplam hemosit sayıları parazitlemeyi müteakip azalmış ve bu azalma hem granülosit hem de plazmatosit sayısında meydana gelen azalmadan kaynaklanmıştır [181]. Parazitoit zehirinin Diptera larvalarının hemositleri üzerine morfolojik etkileri gösterilmiş, parazitleme sonrası konakta hemosit sayısının azaldığı tespit edilmiştir [103, 177]. Endoparazitoit türler ile yapılan çalışmalar konak hemosit sayısı, morfolojisi ve canlılığındaki değişimlerin dışı parazitoit salgılarında bulunan PDVlerinden de kaynaklanabileceğini göstermiştir [245]. *M. demolitor* PDVleri ile enfeksiyon sonucu apoptozise maruz kalan granülositlerden dolayı konak *P. includens* hemositlerinin sayısı azalmıştır [175]. *Cotesia rubecula* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae) PDVlerindeki bir proteinin konak *P. rapae* hemositlerinin dağılma davranışına aktinlerine bağlanıp hücre iskeletini bozarak etki ettiği belirlenmiştir [246]. *C. kariyai* tarafından parazitlenen *P. separata*'da toplam hemosit sayıları önemli derecede azalmıştır [178]. Aynı parazitoitin PDVleri tek başına konağa enjekte edildiğinde toplam hemosit sayısında değişikliğe neden olmamış, zehir enjekte edildiğinde ilk 1 saatte hemosit sayıları azalmış ancak diğer saatlerde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş, zehir ve PDV enjeksiyonu bir arada yapıldığında ise tüm zaman dönemlerinde hemosit sayıları azalmıştır [178]. Araştırmacılar zehirin hemosit sayısını azaltmada PDV fonksiyonu başlayana kadar ilk etkiyi gösterdiğini, ilerleyen zamanlarda ise PDV ve zehirin birlikte etki gösterdiğini savunmuşlardır [178]. Ancak, üreme sistemi ile ilgili mikroskobik çalışmalarda dışı parazitoitlerin üreme sisteminde PDVlere rastlanmamış olması *P. turionellae* için bu olasılığı ortadan kaldırmaktadır. Parazitlenme ve zehir enjeksiyonunun hemosit sayısı üzerindeki etkisinin benzer olması toplam hemosit sayısındaki düşüşün daha çok spesifik konak dokuları üzerine etki eden *P. turionellae* zehirinden kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Benzer bir tür olan *P. hypochondriaca* zehirinin konağını öldürebileceği ve bunun bağışıklık sisteminin baskılanması sonucu olabileceği daha önceden öne sürülmüştür [247, 248]. Buna ilaveten, *P. hypochondriaca* zehirinin enjeksiyonunu takiben 32 saat sonra *L. oleracea* larval hemosit sayılarının % 56 oranında azaldığı tespit edilmiş ve zehirin hemosit davranışı, morfolojisi ve canlılığına potansiyel etkileri olduğunu göstermiştir [39]. *P. turionellae* zehir içeriğinde bulunan bileşenler melittin ve fosfolipaz B vasıtası ile zehirin kültüre alınan hücrelerde litik ve sitotoksik etkisi olduğunu gösteren daha

önceki bir çalışma, parazitoit zehirinin konak hemositlerinin sayısı üzerindeki etkisini gösteren bu çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir [228].

Hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* pupunda farklı hemosit sayıları incelendiğinde dolaşımdaki hemositlerin yarısından fazlasının granülositler olduğu onu takiben ikinci en sık karşılaşılan hemosit tipinin plazmatositler olduğu, diğer hemosit tiplerinin ise hemolenfte çok düşük oranda bulunduğu tespit edildi (Tablo 3.5, 3.6, 3.7). Bununla beraber parazitlenme özellikle dördüncü saatte granülositlerin sayısını önemli derecede azalttı (Tablo 3.5, Şekil 3.11) ve plazmatositlerin sayısında artışa neden oldu (Tablo 3.6, Şekil 3.12). Yüksek KEZ dozlarında ise zamana bağlı olmaksızın granülosit sayılarında azalmalar ve plazmatosit sayılarında artış tespit edildi ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Zehir enjeksiyonu ve parazitlenme konak *G. mellonella*'da sferülositler, önositoidler ve prohemositleri içeren diğer hemosit tipleri sayılarında anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Tablo 3.7, Şekil 3.13).

Parazitlenmenin konak farklı hemosit tiplerine etkileri genellikle larval evrede belirlenmiştir. *Campoletis sonorensis* (Cameron) (Hymenoptera: Ichneumonidae) /*H. virescens* sisteminde parazitlemeyi takiben granülosit sayıları artmış, plazmatosit sayıları azalmıştır ancak farklı hemosit sayıları zehir enjeksiyonundan etkilenmemiştir [157]. *M. demolitor*/ *P. includens* [114] ve *Chelonus inanitus* (L.) (Hymenoptera: Braconidae) /*Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) [249] sistemlerinde ise parazitlenme farklı hemosit tipleri sayılarında bir değişikliğe neden olmamıştır. Ektoparazitoit *Eulophus pennicornis* (Nees) (Hymenoptera: Eulophidae) zehir enjeksiyonu ve parazitlemesine bağlı olarak konak *L. oleracea* farklı hemosit tipleri sayılarında değişiklik gözlenmemiş ancak parazitlemeyi takiben 6 gün sonra toplam hemosit sayıları azalmıştır [36]. Araştırmacılar toplam hemosit sayılarındaki bu azalmanın tek bir hemosit tipinin azalmasından değil genel olarak tüm hemosit tiplerinin oranlarının azalmasından kaynaklandığını savunmuşlardır [36]. Endoparazitoit *C. plutellae* zehiri konak *P. xylostella*'da plazmatositlerin yayılma davranışlarını, özellikle yüksek dozlarda granülosit ve plazmatositlerin canlılıklarını azaltmıştır [179]. *M. pulchricornis* parazitlemesine bağlı olarak konak *P. separata* larvasında granülositlerin sayısı 48'inci saatte anlamlı derecede

azalmıştır. [176]. Araştırmacılar bu azalmanın zehir içeriğinde bulunan virüs benzeri partiküllerden kaynaklandığını ve partiküllerin granülosit apoptozuna neden olduğunu tespit etmişlerdir [176]. Parazitlemenin pup evresinde farklı hemosit sayılarına etkilerinin belirlendiği bir çalışmada konak *P. rapae*'nin pupal endoparazitoit *P. puparum* tarafından parazitlenmesi sonucu konak pupunda plazmatositlerin azaldığı, granülosit sayılarının ise arttığı belirlenmiştir [50]. Farklı konak parazitoit sistemlerinde toplam ve farklı hemosit sayılarında zehir ve parazitlemenin etkisi hakkında genel bir çerçeve çizmek zordur. Farklı parazitoit türlerin konak - parazitoit ilişkisi içerisinde konak bağışıklık sisteminin temel unsurları olan hemositler üzerinde ortaya çıkardığı etkiler farklıdır. Parazitleme veya deneysel olarak zehir enjeksiyonuna bağlı olarak hemosit sayılarında ortaya çıkan artma veya azalmalara neden olan mekanizmalar ise tam olarak açığa çıkarılmamıştır. Parazitleme sonucu hemosit sayılarında ortaya çıkan azalmaların konağa aktarılan PDVlerin hemositlerde apoptozise neden olmasından kaynaklandığı savunulmaktadır [178]. Ancak *P. turionellae* gibi PDV'lerinden yoksun olan parazitotilerde zehir salgısının apoptozise neden olduğuna dair çok çalışmaya rastlanmamıştır. PDV'lerinden yoksun *P. hypocondriaca*'dan elde edilen zehir konak *L. oleracea* hemositlerinde doza bağlı bir şekilde apoptosize neden olmuştur [186]. Benzer şekilde *P. turionellae* zehiri ve parazitlemesi sonucu konak *G. mellonella* pup ve larvasında toplam hemosit sayılarında meydana gelen azalmanın da hemosit apoptozu ve mitotik indekste meydana gelen farklılaşmalar sonucu oluştuğu tez çalışması kapsamında bildirilmektedir.

Hemositlerde, yabancı organizmalara veya toksik maddelere karşı bağışıklık tepkilerini ortaya koyarken programlanmış hücre ölümlerinin (apoptozis) meydana geldiği [183, 184], hemosit şekillerinde ve mitotik indekste farklılaşmalar olduğu [101, 178] belirlenmiştir. Hücre ölümü konak – parazitoit ilişkisi içinde genel bir özelliktir ve apoptozis ve/veya onkozis parazitoit larvasının konak içinde başarılı bir şekilde gelişebilmesi için konak uygunluğunun (ör: gelişimin durması, konak bağışıklık sisteminin baskılanması, konak metabolizmasının indirgenmesi veya yeniden düzenlenmesi, konak lipidlerinin larval beslenme için salınması) düzenlenmesinde oldukça önemli görünmektedir [51].

Tez kapsamında zehir içeriğinde VLP ve PDV'lerinden yoksun *P. turionellae* tarafından doğal olarak parazitlenen veya dişi parazitoit farklı zehir dozlarının deneysel olarak konağa enjekte edilmesi ile konak hemositlerinde apoptotik ve mitotik indekste meydana gelen değişiklikler araştırıldı. Acridine orange ve ethidium bromide ile boyanmış *G. mellonella* hemositlerinde zehir enjeksiyonu ve parazitlemeye bağlı olarak hemolenfte görülen apoptotik hücrelerin oranı konak gelişim evresine bağlı olarak değişkenlik gösterdi. Pupal evrede boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda apoptotik ve nekrotik hemositlerin oranında hiçbir işleme tabi tutulmamış *G. mellonella* puplarına kıyasla farklılık bulunmadı (Tablo 3.13, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24). Yüksek zehir dozları ve parazitlemeye bağlı olarak pupal hemositlerde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında erken ve geç apoptotik hemositlerin oranı % 50'den fazla artış gösterdi (Tablo 3.13, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24). Aksine, nekrotik hemositlerde sadece parazitlenen puplarda 24'üncü saat sonunda anlamlı bir artış meydana gelirken larvalarda farklılık görülmedi (Tablo 3.15, Şekil 3.31, 3.32, 3.33). Larval evrede boş enjeksiyon ve PBS enjeksiyonu yapılan gruplarda apoptotik hemositlerin oranı hiçbir işleme tabi tutulmamış larvalara benzerlik gösterdi. Düşük zehir dozlarında erken ve geç apoptotik hemositlerin oranı değişmezken, anlamlı artışlar 0,1 ve 0,5 KEZ dozlarında gözlemlendi (Tablo 3.15, Şekil 3.31, 3.32, 3.33). Zehir enjeksiyonuna bağlı olarak *P. turionellae* zehirinin pupların hemosit canlılığı üzerindeki etkisi larvalarla karşılaştırıldığında çok daha güçlüydü. Zehirin farklı dozlarının konak hemositlerinde apoptotik indekse etkilerinin belirlendiği çalışmamızda konak puplarının daha çok etkilendiğini gösteren bu sonuçlarımız dişi parazitoitlerin ovipozisyon tercihlerinde hedef olarak konak puplarını seçmesi ile tutarlılık göstermektedir.

Parazitoit kaynaklı salgıların konak hemosit apoptozisine neden olduğunu gösteren çalışmalarda genel olarak parazitoit kaynaklı PDV veya VLP'e odaklanılmıştır [175, 176]. *P. includens*'de parazitoit *M. demolitor* PDVlerinin apoptozise neden olarak granüler hücrelerin sayısını azalttığı tespit edilmiştir [175]. Başka bir çalışmada, parazitoit *M. pulchricornis* zehirinde bulunan VLPler konak *P. separata*'ya enjekte edildiğinde bazı hemositlerin yüzeylerinde kabarcıklar oluşarak şekillerinin bozulduğu ve kromatinlerin yoğunlaşp parçalanarak tipik apoptotik

hücre görünümünü kazandığı belirlenmiştir [176]. Apoptozis geçiren hemositlerde tipik olarak hücrede küçülme, hücre zarında kabarcıklaşma, kromatinde yoğunlaşma ve DNA'nın parçalanması dikkat çekmektedir [183, 185]. *D. semiclausum* tarafından parazitlenen *P. xylostella*'da ise prohemositlerin nekrozu ve hematopoetik organın tahribatı görülmüş ancak çalışma sonuçlarımızın aksine apoptotik hemositler tespit edilememiştir. Çalışmada parazitlenme konak hemositlerinin canlılığını etkilememiştir [154].

*P. hypochondriaca* [39, 247], *P. puparum* [50, 250], *P. turionellae* [228] ve *N. vitripennis* [44] gibi PDV ve diğer simbiyotik virüslerden yoksun parazitoit türlerde zehirin tek başına konak bağışıklık sistemi üzerinde etkisi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. *P. puparum* / *P. rapae* sisteminde zehirin tek başına hemosit yayılmasını ve enkapsülasyon davranışını engelleyebildiği gösterilmiş ancak hemositlerin hücre iskeletinin zehir tatbikinden etkilenmediği ve canlılıklarını devam ettirebildikleri tespit edilmiştir [50]. Ektoparazitoit *N. vitripennis* zehirinin farklı böcek türleri ve omurgalı hayvanlara ait çeşitli dokulardan alınan hücrelerde oluşturduğu sitotoksik etkiler incelenmiş ve hücrelerde meydana gelen doza ve zamana bağlı tepkiler karşılaştırılmıştır [44]. Tüm hücrelerde, zehire tepki olarak görülen morfolojik değişim, sırası ile sitoplazmik uzantıların oluşması, plazma zarında kabarcıkların oluşması, plazma ve çekirdek zarlarının şişmesi, çekirdek materyalinin yoğunlaşması ve hücre parçalanması şeklinde olmuştur [44]. Ancak, zehirin sitotoksik aktivitesinde türe bağlı farklılıklar görülmüş, omurgalı hücreleri böcek hücrelerine, doğal konak olmayan türlere ait hücreler ise doğal konak hücrelerine oranla daha geç ve daha yüksek dozlarda tepki vermiştir [44]. Zehire maruz kalan hücrelerin ölümü tamamen engellenemese de ozmotik koruyucuların kullanımı ile yavaşlamış veya hücre dışı iyonların seçici olarak artırımı ile hızlanmıştır [44]. Onkoziste zehirin toksik etkisi ile plazma zarında açtığı porlardan önce iyonların ve ardından da suyun ozmozla hücre içine geçişi ile hücrenin şişerek parçalandığı ifade edilmiştir [44]. Onkotik hücrelerde, hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyesinin artışı sonucu hücre iskeleti-hücre zarı bütünlüğünün bozulması ile plazma zarında kabarcıkların oluştuğu, bu bozulmanın  $Ca^{+2}$  ile aktiflenen fosfolipaz aktivitesinin hücredeki yağ asitlerini serbest bırakması ile gerçekleştiği tespit edilmiştir [44]. *P. turionellae* zehirinin *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)'den elde

edilen embriyonik hücre hattı (BTI-TN-5B1-4) üzerindeki etkilerinin belirlendiği başka bir çalışmada in vitro olarak zehirin plazma membran geçirgenliğini değiştirip bazı hücrelerde şişmeye neden olduğu ve bunun sonucunda zehir tatbik edilen bir kısım hücrelerin onkozis ile öldüğü bildirilmiştir [239]. Ancak araştırmacılar hücrelerin morfolojik incelenmesi sonucu hücrelerin büyük bir kısmının ölüm şeklinin onkozis olmadığını, zehir tatbikine bağlı olarak hücre membranında kabarcıklar oluşması sonucu ölüm şeklinin apoptozis olabileceği sonucuna varmışlardır [239]. Farklı bir çalışmada dişi ovipozisyon salgıları içerisinde PDV ve VLP bulunmayan *P. hypocondriaca* zehirinin konağı *L. oleracea* hemositlerini doza bağlı olarak artan bir oranda öldürdüğü rapor edilmiştir [186]. Zehir konsantrasyonuna bağlı olarak hemosit canlılığında azalma olduğunu gösterdiğimiz çalışma sonuçlarımız yakın bir tür olan *P. hypocondriaca* zehiri ile elde edilen sonuçlarla [186] paraleldir.

Viral olarak enfekte olmuş konaklarda bağışıklık sisteminin baskılanması hücresel seviyede hücre iskeletinin bozulması, hemositlerin toplanması ve yayılma ve yabancı yüzeylere yapışma davranışlarının engellenmesi ve apoptotik yolla hücre ölümü sonucu hemosit sayılarında meydana gelen azalmalar ile gerçekleşmektedir [114, 175, 246]. Bununla beraber konak immün sisteminde meydana gelen bu değişimleri başlatan mekanizmalar hakkında fazla bir bilgi bulunmamaktadır. Hemositlerde hücre iskeletinde meydana gelen değişimlerin apoptotik yollarla bağlantılı olması muhtemeldir. Örneğin sitoplazmik kabarcıkların oluşumu apoptotik hücrelerin plazma membranlarında görülmektedir [251]. Bu kabarcıkların oluşması genellikle hücre iskeleti - hücre zarı ilişkilerinin bozulmasını içermektedir ve bu bozulmanın  $Ca^{+2}$ -bağlı proteazların aktivasyonundan kaynaklandığı savunulmaktadır [252, 253]. Proteaz aktivasyonu hücre içi kalsiyum seviyesinde artış olmasını gerektirir [254].  $Ca^{+2}$ 'un L-tipi kalsiyum kanallarıyla plazma membranından hücre içine girmesi ve hücre içi depolardan kalsiyum mobilizasyonu birçok virüsün temel etkisidir [255]. Bununla beraber parazitoit zehirinin neden olduğu apoptotik hücresel yollar tam olarak bilinmemektedir. Parazitoit zehirinin kendi konak hemositleri üzerinde etkili olduğu göz önüne alındığında zehirin etki mekanizmasının reseptör-aracılı olduğu düşünülmektedir [256]. Daha önce böcek zehirlerinde var olduğu tespit edilen metalloproteinazlar [257] apoptozisi tetikleyen sitotoksik etkilerin

nedeni olabilir. Yapılan çalışmalarda yılan zehiri metalloproteinazları olan jararhagin ve BAP1'in apoptozise neden olduğu bildirilmiştir [258, 259].

Lepidoptera'da dolaşımdaki hemositler hematopoietik organdan salınmakta diğer yandan da hali hazırda dolaşımdaki hemositlerin mitoz bölünmesi ile sağlanmaktadır [126, 154]. Kontrol gruplarımızdan elde ettiğimiz sonuçlar *G. mellonella*, *B. mori* ve *E. declarata* [121, 124, 189, 190] türlerinde normal olarak dolaşımdaki hemositlerin yaklaşık %1-8'inin mitotik fazda olduğu bulgusu ile uyum içerisindedir. Ancak gerek zehir enjeksiyonu gerekse de doğal parazitlenme ile çalışılan tüm zamanlarda pupalarda tüm dozlarda, larvalarda ise yüksek zehir dozlarında (>0.05) mitotik hemositlerin oranı %0,5'in altına düştü (Tablo 3.17, 3.19, Şekil 3.35, 3.37). Konak hemositlerinde mitoz endoparazitoit zehirinin veya parazitlemenin etkisini araştıran çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bir çalışmada *C. kariyai* PDV ve zehir enjeksiyonu tatbik edilen *P. separata* hemositlerinde mitoz bölünmenin durduğu tespit edilmiştir [178]. Araştırmacılar, zehir ve PDV etkisi ile 4C ve 8C ploidilerinin kaybolduğunu, PDVlerin hücre döngüsünü baskılayacak hücrel plazma faktörleri ürettiğini öne sürmüşlerdir [178]. Böceklerde hücre bölünmesi böceğin gelişim evresine bağlıdır ve 20-hidroksiekdizon (20E) ve juvenil hormon (JH) gibi hormonların hemolenfteki konsantrasyonlarıyla düzenlenir [260]. Konak- parazitoit ilişkisinde parazitlemeye bağlı olarak bu endokrin sinyallerin değişime uğraması ile ilgili literatürde çalışmalar mevcuttur. Örneğin *C. nigriceps* tarafından parazitlenen konak larvasında protorasik bezlerin inaktivasyonuna bağlı olarak ekdisteroit seviyesi azalmış ve pupal metamorfoz engellenmiştir [261]. Diğer yandan farklı konak-parazitoit sistemlerinde parazitlemenin antimetamorfik etkileri, endojen juvenil hormonun biyosentez ve metabolizmasındaki değişikliklere bağlı olarak juvenil hormon seviyesindeki artışa bağlanmıştır [262, 263]. *P. turionellae* parazitlenmesi veya zehir enjeksiyonuna bağlı olarak konak *G. mellonella* hemositlerinde mitotik indekste meydana gelen değişimler hormonal olabilir. Ancak parazitoit zehirinin konak hemositlerinde mitoz bölünmeyi azaltma veya durdurmasını tetikleyen mekanizmalar için hücrel seviyede ayrıntılı çalışmaya ihtiyaç vardır.

Böcek bağışıklık sisteminin önemli bir unsuru olan hücresel savunma tepkileri yabancı maddelerin fagositoz, nodülasyon ve enkapsülasyonunu kapsamaktadır [52, 55]. Konak böceğin fizikokimyasal bariyerlerini aşıp vücut boşluğu içerisine giren ve gelişimini burada sürdüren endoparazitoit yumurta ve larvaları, konağın kendinden olmayanı algılaması sonucu konak hücresel savunma tepkilerine maruz kalmaktadırlar [38, 39, 49, 50]. Başarılı bir parazitlenme ve parazitoit neslinin devamı ancak konak böceğin savunma tepkilerinin parazitoit tarafından baskılanması sonucu olabilmektedir [44]. Endoparazitoit kaynaklı yumurtalık proteinleri, VLPler ve/veya PDVleri gibi ovipozisyon esnasında konağa enjekte edilen ve konak hemositlerinin hem sayısına hem de davranışlarına, özellikle de yapışma ve dağılımlarına etki eden faktörler konak bağışıklık sistemini zayıflatmaktadır [21, 39, 156 – 159]. Konak bağışıklık sisteminin zayıflatılmasında endoparazitoit zehirinin rolü ise birçok durumda tam olarak aydınlatılamamıştır [39].

Böcek vücut boşluğuna giren yabancı obje ve parazitlere karşı en temel bağışıklık tepkisi enkapsülasyondur [55, 59, 183]. Enkapsülasyon tepkisi farklı böcek ordolarında detaylı olarak çalışılmış ve Lepidopterlerde enkapsülasyondan sorumlu temel hemosit tiplerinin granülositler ve plazmatositler olduğu tespit edilmiştir [55, 108]. Son yıllarda yapılan çalışmalar farklı parazitoit türlerin konak enkapsülasyon tepkisini baskılamak için farklı stratejiler geliştirdiğini göstermektedir. Bu stratejiler içerisinde endoparazitoit zehirinin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamakla beraber bazı araştırmacılar brakonid türlerde zehirin PDV ve kaliks sıvısının etkilerini arttırdığını savunmaktadırlar [24, 174, 264]. Bununla beraber simbiyotik virüslerden yoksun olan endoparazitoit türlerde zehirin tek başına enkapsülasyonu baskılamada etkili olduğunu gösteren sınırlı sayıda çalışma literatürde mevcuttur. Örneğin yakın bir tür olan *P. hypocondriaca* ve *P. puparum*'dan elde edilen zehirin konakları *L. oleracea* ve *P. rapae*'de enkapsülasyon tepkisini baskıladığı gösterilmiştir [39, 50]. Diğer yandan parazitoit ovipozisyonuna bağlı olarak konak hemositlerinin enkapsülasyon davranışlarının baskılanması ile ilgili çalışmalarda genellikle yumurta ve larva parazitoitlerine odaklanılmış, pupal evrede enkapsülasyonun baskılanmasına çok az sayıda çalışmada rastlanmıştır [50, 192, 250].



*P. turionellae* zehiri enjekte edilen veya parazitlenen *G. mellonella*'da enkapsülasyon tepkisi konak gelişme evresine bağlı olarak oldukça farklılık gösterdi. Çalışmamızda, Sephadex A-25 boncukları için konak puplarında da enkapsülasyon reaksiyonu görülse de etki larvalardaki kadar güçlü değildi. Hiçbir işleme tabi olmayan kontrol grubunda sadece 4 saat sonra larva içine enjekte edilen boncukların % 46,3'ünün çok katmanlı olarak hemositlerle çevrilmiş olması güçlü bir enkapsülasyonun oluştuğunu göstermektedir (Tablo 3.22, Şekil 3.40). Ancak, bu oran puplarda sadece % 10,2 olarak tespit edildi (Tablo 3.21, Şekil 3.39). Bu durum hücrel savunma reaksiyonlarının *G. mellonella*'da pupal evreye kıyasla larval evrede daha hızlı oluştuğunu göstermektedir. Zehirin farklı dozlarının enjeksiyonu ve parazitleme güçlü enkapsülasyon oranları açısından larva ile pup arasındaki bu farkı devam ettirdi. Pupal hemositlerde zehir enjeksiyonu veya parazitlemeyi müteakip enkapsülasyonun larvalara nispeten daha zayıf olması larvaya oranla pupu seçen ergin dişi parazitoidlerin ovipozisyon tercihlerinin belirlendiği daha önceki çalışma sonuçları [195] ile tutarlılık göstermektedir.

Sephadex A-25 boncuklarının *G. mellonella* puplarına enjeksiyonunu müteakiben 4 saat sonra güçlü enkapsüle olan boncukların oranı kontrol grupları, zehir enjeksiyonu yapılmış gruplar ve parazitlenmiş gruplar arasında benzerlik gösterdi (Tablo 3.21, Şekil 3.39). Bununla beraber güçlü enkapsüle olmuş boncukların oranında pupal evrede enjeksiyonu müteakip 24 saat sonra özellikle en yüksek zehir dozu olan 0,05 KEZ ve parazitlenmiş gruplarda kontrol grubuna kıyasla çok önemli bir azalma gözlemlendi (Tablo 3.21, Şekil 3.39). Zehirin 0,05 kese eşdeğer dozunun 24 saat sonundaki enkapsülasyon oranı ile parazitlemede görülen benzer olması dişi parazitoid için pupta daha önce belirlenen [228] LD<sub>99</sub> değeri olan 0,06 KEZ ile uyum içerisinde görünmektedir. Benzer bir tür olan *P. hypocondriaca* zehir enjeksiyonuna bağlı olarak konak *L. oleracea*'de 1/5 kese eşdeğeri zehir dozunun hemositik enkapsülasyonu tamamen baskılamada yeterli olduğu bildirilmiştir [192]. Pupal endoparazitoid olan *P. puparum* zehir enjeksiyonu, konak *P. rapae*'de enkapsülasyon tepkisini ve hemositlerin yayılma davranışını baskılamıştır [50]. Araştırmacılar enkapsülasyonun baskılanmasının, plazmatositlerin yayılma davranışının baskılanmasının sonucu olduğunu savunmuşlardır [50]. Konak *G. mellonella* larvalarında Sephadex A-25 boncuklarının enkapsülasyonuna zehirin

etkisinin belirlendiği deneylerde ise hiçbir işleme tabi tutulmamış, boş enjeksiyon yapılmış ve PBS enjeksiyonu yapılmış gruplarda enkapsüle olmamış, zayıf enkapsüle olmuş ve güçlü enkapsüle olmuş boncukların oranı birbirine benzerlik gösterdi (Tablo 3.22, Şekil 3.40). *P. turionellae* 0,1 ve 0,5 KEZ dozlarında güçlü enkapsüle olmuş boncukların oranı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldı (Tablo 3.22, Şekil 3.40). 0,5 KEZ dozunda zehir enjeksiyonunu müteakip 4 ve 24 saat sonra enkapsüle olmamış boncukların oranında %50'den fazla artış oldu (Tablo 3.22, Şekil 3.40).

Literatürde ovipozisyon esnasında ergin dişi parazitoit tarafından konak vücut boşluğu içerisine bırakılan salgıların, konak hemositlerinde enkapsülasyon davranışını baskıladığını gösteren çok sayıda çalışma olsa da bu çalışmalarda genellikle PDV veya VLP içeren parazitoitlere odaklanılmıştır. Örneğin larval endoparazitoit *M. pulchricornis* tarafından parazitlenen konak *P. separata* 'da hemositlerin enkapsülasyon davranışı önemli derecede azalmıştır [176]. Aynı çalışmada virüs benzeri partiküllerin konağa enjekte edilmesi enkapsülasyonu baskılamış ancak zehir enjeksiyonu etki göstermemiştir [176]. *O. furnacalis* larvalarına *M. cingulum* zehir ve yumurtalık proteinleri enjekte edildiğinde zehirin tek başına enkapsülasyonu baskılamada etkili olmadığı ancak yumurtalık proteinleri ve zehir karışımının hemositlerin enkapsülasyon davranışını baskıladığı belirtilmiştir [191]. Başka bir çalışmada *D. semiclasum* parazitlenmesine bağlı olarak konak *P. xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) hemositlerinde, parazitlemeyi takiben 24 saat sonra hemositlerin enkapsülasyon davranışlarında baskılanma gözlenmiştir [154]. *C. plutella* tarafından parazitlenen ve parazitlenmemiş konak *P. xylostella* larvasında enkapsülasyon araştırılmış, enjeksiyonunu takiben 24 saat sonra parazitlenmemiş larvada boncuk etrafında melanize olmuş enkapsülasyon materyali birikirken parazitlenmiş larvada sadece birkaç hemosit boncuklara yapışmış ve enkapsülasyon baskılanmıştır [181]. PDV veya VLP içeren bu parazitoit türlerin konak hemositlerinde enkapsülasyonu baskılaması hücresel seviyede, hücre iskeletinde bozulmalar, yabancı yüzeyler üzerinde hemositlerin yayılma kabiliyetinin bozulması, apoptozis ve dolaşımdaki hemosit sayılarında azalmalar ile sağlanmaktadır [114, 148, 159, 175, 246].

Benzer şekilde yakın bir tür olan ve simbiyotik virüsler içermeyen *P. hypocondriaca* zehirinin konak hemositlerinin morfoloji ve yayılma davranışını etkilediği ve enkapsülasyon davranışını baskıladığı gösterilmiştir [39]. Araştırmacılar zehirin bu etkisini hemositlere zarar vererek ve yayılmalarını baskılayarak gerçekleştirdiğini öne sürmüşlerdir [39]. Zehirin tek başına konak hemositlerinde enkapsülasyon davranışını baskıladığı *P. puparum* / *P. rapae* [50, 250] ve *C. glomeratus* / *P. rapae* parazitoit konak sistemlerinde de gösterilmiştir [174]. *P. puparum* zehir bileşenleri anyon değişim kromatografisi ile izole edilmeye çalışılmış ve elde edilen 24.1 kDa'luk Vn.11 adı verilen zehir proteini araştırmacılar tarafından asıl immün baskılayıcı protein olarak ele alınmıştır [250]. Yapılan in vitro çalışmalarda bu zehir bileşeninin konak *P. rapae* hemositlerinde tek başına hemositlerin yayılma ve enkapsülasyon davranışını baskıladığı gösterilmiştir [250]. Farklı bir çalışmada yine simbiyotik virüslerden yoksun *P. hypocondriaca* zehirinden VPr3 adı verilen 30-33 kDa'luk bir protein kromatografik yöntemlerle izole edilmiş ve bu proteinin hemosit anti-agregasyon proteini olarak iş gördüğü ve konak hemositlerinde enkapsülasyonu baskıladığı tespit edilmiştir [232]. Bu çalışmalar PDV ve VLP'den yoksun parazitoitlerde konak hücrel savunma tepkilerinin baskılanmasını sağlayan zehir bileşenlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu bakımından ilk çalışma olmalarıyla dikkat çekmektedir [250]. Simbiyotik virüsler içeren *C. rubecula* ile yapılan çalışmada zehirden izole edilen 58 kDa'luk kalretikulin benzeri proteinin konak *P. rapae* larvasında hemositlerin yayılma davranışını baskıladığı ve böylelikle gelişen parazitoitin enkapsülasyonunu engellediği tespit edilmiştir [265]. Araştırmacılar parazitoit zehirden elde edilen bu kalretikulin benzeri proteinin, erken enkapsülasyon reaksiyonlarına aracılık eden konak hemosit kalretikulin proteini bağlanma bölgesine bağlanan bir antagonist olarak fonksiyon gösterdiğini savunmuşlardır [265]. *G. mellonella* ile yapılan bir çalışmada böcek içerisine enjekte edilen sefroz boncuklarından enkapsülasyonun erken evresinde izole edilen 47 kDa'luk proteinin bilinen kalretikulin proteinlerine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir [266]. Kalretikulin endoplazmik retikulumda multifonksiyonel bir Ca<sup>+2</sup> bağlayıcı proteindir ve *G. mellonella* hemositlerinde de var olduğu gösterilmiştir [266]. Daha önce yapılan bir çalışmada kalretikulin molekülünün nötrofiller üzerinde bulunduğu ve mikrobial enfeksiyon esnasında kalretikulinin G- proteini aracılığıyla sinyal ileterek nötrofilleri aktive ettiği

belirtmiştir [267]. Buna dayanarak Choi ve ark. *G. mellonella* hemositlerinde var olduğu tespit edilen kalretikülin proteininin hücrelerin kendinden olmayanın tanınmasında iş gördüğünü savunmuşlardır [266]. *P. turionellae* zehirinin konak *G. mellonella* hemositlerine ve *Trichoplusia ni* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) embriyo hücrelerine etkilerinin belirlendiği başka bir çalışmada sadece zehir tatbik edilen *G. mellonella* hemositlerinde çok miktarda vakuol oluşumu gözlenirken, anti-kalretikülin içeren zehir uygulandığında çok az vakuol oluşumu gözlenmiştir [268]. Araştırmacılar bu durumun *P. turionellae* zehirinde kalretikülin varlığını gösterdiğini bildirmişlerdir [268]. *G. mellonella* hemositlerinin aksine, sadece zehir veya anti-kalretikülin tatbik edilen *T. ni* embriyo hücrelerinde aşırı oranda vakuol oluşumu gözlendi [268]. Embriyo hücrelerinde kalretikülin bağlanmasını engelleyerek zehir etkisinden korunma sağlanamaması parazitoit zehirinin hedef hücrelerde spesifik etki gösterdiğini ortaya çıkardı [268]. *P. turionellae* zehir içeriğinde kalretikülin varlığının gösterilmesi, bu proteinin *G. mellonella*'da enkapsülasyon reaksiyonlarında görev alan kalretikülin benzeri proteinin bağlanma bölgesine bağlanarak enkapsülasyon tepkisini baskılayan bir protein olabileceğini düşündürmektedir ancak bunun için ayrıntılı çalışma yapılması gerekmektedir.

*G. mellonella* pupal evresinde konak vücut boşluğu içerisine enjekte edilen boncukların melanizasyon oranlarında 4 saatlik zaman diliminde bir farklılık görülmezken, 24 saatlik dönemde zehir enjekte edilmiş ve parazitlenmiş gruplarda anlamlı azalmalar tespit edildi (Tablo 3.23, Şekil 3.41). *G. mellonella* larval evresinde ise enjeksiyonu müteakip 4 saatlik dönemde melanizasyon oranlarında en yüksek zehir dozu olan 0,5 KEZ dozunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık gözlenirken, 24 saatlik dönemde 0,1 ve 0,5 KEZ dozlarında diğer tüm gruplara kıyasla melanizasyon oranları oldukça düşük bulundu (Tablo 3.24, Şekil 3.42). Böceklerde kütikular yaralanma veya vücut boşluğu içerisine yabancı organizmaların girmesi durumunda ortaya çıkan hemosit aracılı enkapsülasyon reaksiyonlarının sonucu olarak melanizasyon gerçekleşmesi genel bir olgudur [269]. Melaninin serbest radikal süpürücü etkisinden dolayı, enkapsülasyon esnasında parazitoit yumurtası üzerinde melanin birikmesi, sitotoksik radikallerin enkapsülasyon bölgesini hedef almasını, immün savunmanın sadece yabancı yüzey üzerinde gerçekleşmesini ve konak açık dolaşım sistemi içerisinde sitotoksik moleküllerin

diğer bölgelere yayılmamasını sağlar [270, 271]. Yaralanma veya savunma tepkileri sonucu oluşan melanizasyon reaksiyonları böceklerde fenoloksidaz aktivitesine dayandırılmaktadır [269]. Kütikular melanizasyonda fenoloksidazın proenzimi olan profenoloksidazın dolaşımdaki hemositlerden salındığı bilinmektedir [269]. Örnek tanıma molekülleri profenoloksidazın aktif fenoloksidaza dönüşümünü sağlayan ve serin proteinazları da içeren enzimatik yolların aktivasyonunu sağlar [166]. Profenoloksidaz aktivasyonu sonucu oluşan fenolik bileşikler vücut boşluğunda bulunan yabancı maddeler için toksiktir [166]. Yapılan bir çalışmada *C. rubecula* zehirinden izole edilen serin proteinaz homoloğu proteinin konak *P. rapae*'de melanin oluşumunu engellediği gösterilmiştir [166]. *Drosophila melanogaster* (Fallen) (Diptera: Drosophilidae)'de parazitoit *Leptopilina bouvardi* (Barbotin, Carton ve Kelner-Pilaut) (Hymenoptera: Figitidae) yumurtalarının enkapsülasyonu ve melanizasyonu esnasında fenoloksidaz aktivitesinin arttığı bildirilmiş ancak parazitoit aracılı bu aktivasyonun mekanizması çalışılmamıştır [272, 273]. Başka bir çalışmada *Cotesia congregata* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) tarafından parazitlenen *M. sexta* larvalarında hemolenfin melanizasyonu ve fenoloksidaz aktivitesi önemli derecede azalmıştır [274]. *H. armigera* parazitlenmesine bağlı olarak konak hemolenf fenoloksidaz aktivitesinde önemli bir azalma gözlenmiştir [275]. Bir ektoparazitoit olan *E. pennicornis* parazitlenmesine bağlı olarak konak *L. oleracea*'de hemolenf fenoloksidaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak melanizasyon oranı azalmıştır. Ancak melanizasyonda görülen bu azalma zehir enjeksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkmamıştır [38]. *P. turionellae* parazitlenmesi ve zehir enjeksiyonuna bağlı olarak konak enkapsülasyon materyalinde melanizasyonun engellenmesi, *G. mellonella*'da diğer böcek türlerinde olduğu gibi hemolenf fenoloksidaz aktivitesinin azalmasına bağlı olabilir. Bu çalışma sonucunda *P. turionellae* zehir enjeksiyonunun ve parazitlenmesinin doğal konağı *G. mellonella*'nın hem larva hem de pup hemositlerinin enkapsülasyon ve melanizasyon tepkilerinde etkili olması parazitoit zehirinin konağın farklı gelişim evreleri üzerinde etkili olduğunu gösterdi. Bu sonuç, daha önceki çalışmalarda [228] öne sürülen *P. turionellae* zehirinin felç edici etkisinin parazitoit gelişimini kolaylaştırmak için konak hücresel ve humoral bağışıklık sistemini baskılamak şeklinde olduğu görüşünü desteklemektedir.

Parazitlemeyi müteakip konağını felç eden ve yaşamını sürdürmesine izin vermeyen idionobiont tür *P. turionella*'nın hedef hücrelerde hücre canlılığını azaltarak, enkapsülasyon davranışını engelleyerek, mitotik aktiviteyi azaltıp apoptozisi tetikleyerek bu etkileri oluşturduğu değerlendirilmektedir. *P. turionellae*'nin arıcılık ve ziraatte olumsuz sonuçlar yaratan birçok zararlı konak böcek türü üzerinde biyolojik ajan olarak önemli olduğu göz önüne alındığında, parazitoit zehirinin konak bağışıklık sistemi üzerinde etkilerinin belirlenmesinin ileride rekombinant biyolojik insektisitlerin üretimi dahil olmak üzere biyolojik kontrol uygulamalarında yarar sağlayacağı değerlendirilmektedir. *P. turionellae* zehir enjeksiyonunun ve doğal parazitlemenin konak hücresel bağışıklık sisteminin savunma reaksiyonlarında iş gören hemositleri üzerine karşılaştırmalı etkisini ortaya koyan bu çalışmanın, konak regülasyonunda parazitoit salgılarının rolünü daha detaylı olarak anlaşılmasına yardım edeceği, ayrıca, elde edilen verilerin böcek biyokimyası, fizyolojisi, gelişim biyolojisi, biyolojik kontrol ve insan sağlığı ile ilgili çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Graethead, D.J. ve Waage, J.K., “Opportunities for Biological Control of Agricultural Pests in Developing Countries”, World Bank Technical Paper, Number 11, The World Bank, Washington, D.C., U.S.A., (1983) 1.
- [2] Andow, D.A., Ragsdale, D.W. ve Nyvall, R.F., “Ecological Interactions and Biological Control”, Westview Press, Colorado, (1997).
- [3] Tübitak Bülteni, “Biyolojik mücadelede bakterilerin kullanım olanakları”, 2:1, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, (1985), 13.
- [4] Canyurt, M.A., “Tarımda pestisit kullanımının su ürünleri üzerine etkileri”, Kıyı Sorunları ve Çevre Sempozyumu, Belediye Yayınları, Kuşadası, 7, (1994), 345.
- [5] Uçkan, F. ve Gülel, A., “Age-related fecundity and sex ratio variation in *Apanteles galleriae* (Hym., Braconidae) and host effect on fecundity and sex ratio of its hyperparasitoid *Dibrachys boarmiae* (Hym., Pteromalidae)”, *J. Appl. Entomol.*, 126(10), (2002), 534.
- [6] Godfray, H.C.J, Parasitoids. Behavioral and evolutionary ecology, Princeton University Press, New Jersey, (1994), p. 473.
- [7] Wharton, R.A., “Bionomics of the Braconidae”, *Ann. Rev. Entomol.*, 38, (1993) 121.
- [8] Driesche, R.G., “Field measurement of population recruitment of *Apanteles glomeratus* (L.) (Hymenoptera; Braconidae), a parasitoid of *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera ; Pieridae) and factors influencing adult parasitoid foraging success in kale”, *Bull. Ent. Res.*, 78, (1988) 199.
- [9] Faulds, W., “Spread of *Bracon phylacteophagus*, a biocontrol agent of *Phylacteophaga froggatti*, and impact on host”, *NZ. J. For. Sci.*, 21, (1991) 185-193.
- [10] Hirashima, Y., Miura, K., Miura, T. ve Matsuda, S., “Studies on the biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), functional responses of the egg-parasitoids *Trichogramma ostrinia* to host densities”, *Sci. Bull. Fac. Agr.*, Kyushu Univ., (1990) 89.
- [11] Gülel, A., “Studies on the biology of the *Dibrachys boarmiae* (Walker) (Hymenoptera; Pteromalidae), parasitic on *Galleriae mellonella* (L.)”, *Z. Ang. Ent.*, 94, (1982) 138.

- [12] Melton, C.W. ve Browning, H.W., “Life history and reproductive biology of *Allorhogas pyralophagus* (Hymenoptera; Braconidae), a parasite imported for release against *Eoreuma loftini* (Lepidoptera; Pyralidae)”, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 79 (3), (1986) 402.
- [13] Vinson, S. B., “Host selection by insect parasitoids”, *Ann. Rev. Entomol.*, 21, (1976) 109-133.
- [14] Van Alphen, J.J.M. ve Visser, M.E., “Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids”, *Ann. Rev. Entomol.*, 35, (1990) 59.
- [15] Bin, F., Vinson, S.B., Strand, M.R., Colazza, S. ve Jones, W.A., “Source of an egg kairomone for *Trissolcus basalus*, a parasitoid of *Nezara viridula*”, *Physio. Entomol.* 18, (1993) 7-15.
- [16] Brower, J.H. ve Press, J.W., “Interactions between the egg parasite *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera; Trichogrammatidae) and a predator, *Xyloris flavipes* (Hemiptera; Anthocoridae) of the almond moth, *Cadra cautella* (Lepidoptera; Pyralidae)”. *J. Ent. Sci.*, 23(4), (1988) 342-349.
- [17] Brower, J.H. ve Press, J.W., “Interactions of *Bracon hebetor* (Hymenoptera; Braconidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera; Trichogrammatidae) in suppressing stored-product moth populations in small inshell peanut storages”, *J. Econ. Entomol.*, 83(3), (1990) 1096-1101.
- [18] Nealis, V. ve Frankenhuyzen, K.V., “Interactions between *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Apanteles fumiferanae* Vier. (Hymenoptera; Braconidae), a parasitoid of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera; Tortricidae)”, *Can. Entomol.*, 122(7/8), (1990) 588-594.
- [19] Obrycki, J.J., Tauber, M.J. ve Tauber, C.A., “*Perilitus coccinellae* (Hymenoptera; Braconidae) parasitization and development in relation to host-stage attacked”, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 78(6), (1985) 852.
- [20] Riechert, S.E. ve Lockley, T., “Spiders as Biological Control Agents”, *Ann. Rev. Entomol.*, 29, (1984) 299.
- [21] Schmidt, O., Theopold, U. ve Strand, M., “Innate immunity and its evasion and suppression by Hymenopteran endoparasitoids”, *BioEssays*, 23, (2001) 344-351.
- [22] Beckage, N.E. ve Gelman, D.B., “Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control”, *Ann. Rev. Entomol.*, 49, (2004) 299-330.
- [23] Coudron, T.A. ve Brandt S.L., “Characteristics of a developmental arrestant in the venom of the ectoparasitoid wasp *Euplectrus comstockii*”, *Toxicon*, 34(11/12), (1996) 1431-1441.



- [24] Tanaka, T., "Calyx and venom fluids of *Apanteles kariyai* as factors that prolong larval period of the host, *Pseudaletia separata*", *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 80, (1987) 530-533.
- [25] Tanaka, T. ve Vinson, S.B., "Depression of prothoracic gland activity of *Heliothis virescens* by venom and calyx fluids from the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps*", *J. Insect Physiol.*, 37(2), (1991) 139-144.
- [26] Tanaka, T., Yagi, S. ve Nakamatu, Y., "Regulation of parasitoid sex allocation and host growth by *Cotesia (Apanteles) kariyai* (Hymenoptera: Braconidae)", *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 85(3), (1992) 310-316.
- [27] Rivers, D.B. ve Denlinger, D.L., "Developmental fate of the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, envenomated by the pupal ectoparasitoid, *Nasonia vitripennis*", *J. Insect Physiol.*, 40(2), (1994) 121-127.
- [28] Rivers, D.B. ve Denlinger, D.L., "Redirection of metabolism in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, following envenomation by the ectoparasitoid, *Nasonia vitripennis* and correlation of metabolic effects with the diapause status of the host", *J. Insect Physiol.*, 40(3), (1994) 207-215.
- [29] Bischof, C. ve Ortel, J., "The effects of parasitism by *Glyptapanteles liparidis* (Braconidae: Hymenoptera) on the hemolymph and total body composition of gypsy moth larvae (*Lymantria dispar*, Lymantriidae: Lepidoptera)", *Parasitol. Res.* 82(8), (1996) 687-692.
- [30] Schopf, A. ve Nussbaumer, C., "Influence of parasitism by *Glyptapanteles liparidis* (Hym., Braconidae) on the haemolymph carbohydrate and glycogen content of its host larva, *Lymantria dispar* (Lep., Lymantriidae)", *J. Appl. Ent.*, 120, (1996) 357-362.
- [31] Reed, D.A. ve Beckage, N.E., "Inhibition of testicular growth and development in *Manduca sexta* larvae parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata*", *J. Insect Physiol.*, 43(1), (1997) 29-38.
- [32] Coudron, T.A., Raqib, A., Brandt, S.L. ve Wright, M.K., "Comparison of the hemolymph proteins in permissive and non-permissive hosts of *Euplectrus comstockii*", *Comp. Biochem. Physiol. B*, 120, (1998) 349-357.
- [33] Digilio, M.C., Isidoro, N, Tremblay, E. ve Pennacchio, F. "Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins", *J. Insect Physiol.*, 46, (2000) 1041-1050.
- [34] Powell, J.E., "Food consumption by tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae reduced after parasitization by *Microplitis demolitor* or *M. croceipes* (Hymenoptera: Braconidae)", *J. Econ. Entomol.*, 82(2), (1989) 408-411.

- [35] Richards, E.H. ve Edwards, J.P., "Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera, noctuidae) by the ectoparasitoid wasp *Eulophus pennicornis*, results in the appearance of a 27 kDa parasitism-specific protein in host plasma", *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29, (1999) 557-569.
- [36] Richards, E.H. ve Edwards, J.P., "Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) by the ectoparasitoid wasp, *Eulophus pennicornis*. Effects of parasitization, venom and starvation on host haemocytes", *J. Insect Physiol.*, 45, (1999) 1073-1083.
- [37] Richards, E.H. ve Edwards, J.P., "Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitoid wasp, *Eulophus pennicornis*, suppresses haemocyte-mediated recognition of non-self and phagocytosis", *J. Insect Physiol.*, 46, (2000) 1-11.
- [38] Richards, E.H. ve Edwards, J.P., "Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitoid, *Eulophus pennicornis*, is associated with a reduction in host haemolymph phenoloxidase activity", *Comp. Biochem. Physiol. B*, 127, (2000) 289-298.
- [39] Richards, E.H. ve Parkinson, N.M., "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*", *J. Invertebr. Pathol.*, 76, (2000) 33-42.
- [40] Marris, G.C., Weaver, R.J., Bell, J. ve Edwards, J.P., "Venom from the ectoparasitoid wasp *Eulophus pennicornis* disrupts host ecdysteroid production by regulating host prothoracic gland activity", *Physiol. Entomol.* 26(3), (2001) 229-238.
- [41] Nakamatsu, Y., Gytoku, Y. ve Tanaka, T., "The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnavirus", *J. Insect Physiol.*, 47(6), (2001) 573-584.
- [42] Nakamatsu, Y., Fujii, S. ve Tanaka, T., "Larvae of an endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes", *J. Insect Physiol.*, 48, (2002) 1041-1052.
- [43] Rinehart, J.P., Denlinger, D.L. ve Rivers, D.B., "Upregulation of transcript encoding select heat shock proteins in flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis* in response to venom from the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis*", *J. Invertebr. Pathol.*, 79, (2002) 62-63.
- [44] Rivers, D.B., Ruggiero, L. ve Hayes, M., "The ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae)", *J. Insect Physiol.*, 48, (2002) 1053-1064.

- [45] Nakamatsu, Y. ve Tanaka, T., “Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource”, *J. Insect Physiol.*, 49, (2003) 149-159.
- [46] Grossniklaus-Burgin, C., Pfister-Wilhelm, R., Meyer, V., Treiblmayr, K. ve Lanzrein, B., “Physiological and endocrine changes associated with polydnavirus/venom in the parasitoid-host system *Chelonus inanitus-Spodoptera littoralis*”, *J. Insect Physiol.*, 44, (1998) 305-321.
- [47] Reed, D.A. ve Brown. J.J., “Host/ parasitoid interactions: Critical timing of parasitoid-derived products”, *J. Insect Physiol.*, 44, (1998) 721-732.
- [48] Lawrence, P.O. ve Lanzrein, B., “Hormonal interactions between insect endoparasites and their host insects”, In: Parasites and Pathogens of Insects, ed. Beckage, N.E., Thompson, S.N., Federici, B.A., Academic Press, San Diego, (1993), p. 59-86.
- [49] Beck, M., Theopold, U. ve Schmidt, O., “Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens*”, *J. Insect Physiol.*, 46, (2000) 1275-1283.
- [50] Cai, J., Ye, G. and Hu, C., “Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): effects of parasitization and venom on host hemocytes”, *J Insect Physiol.*, 50, (2004) 315–322.
- [51] Rivers, D.B, Ergin, E. and Uçkan, F., “Cell death in the host-parasitoid relationship”, In: New Developments in Cell Apoptosis Research, ed. Corvin, A.J., Nova Science Publishers Inc. NY, U.S.A., 2007, p. 69-96.
- [52] Lavine, M.D. and Strand, M.R., “Insect hemocytes and their role in immunity”, *Insect Biochem. Molec.*, 32, (2002) 1295-1309.
- [53] Strand, M.R., “The insect cellular immune response”, *Insect Sci.*, 15, (2008) 1-14.
- [54] Fearon, D.T., “Seeking wisdom in innate immunity”, *Nature*, 388, (1997) 323- 324.
- [55] Strand, M.R. and Pech, L.L., “Immunological basis for compatibility in parasitoid host relationships”, *Annu Rev Entomol*, 40, (1995) 31-56.
- [56] Levin, D.M., An integrin required for the encapsulation immune response in the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae), PhD Thesis, Kansas State University, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas, (2007).

- [57] Chapman, R.F. *The Insects: Structure and Function*, Cambridge University Press, Cambridge (1998).
- [58] Lee, W.J. and Brey, P.T., "Isolation and identification of cecropin antibacterial peptides from the extracellular matrix of the insect integument", *Anal. Biochem.*, 217, (1994) 231-235.
- [59] Gillespie, J.P., Kanost, M.R. and Trenczek, T., "Biological mediators of insect immunity", *Annu. Rev. Entomol.*, 42, (1997) 611-643.
- [60] Hoffmann, J.A., Janeway, C.A. Jr., and Natori, S., *Phylogenetic Perspectives in Immunology: The Insect Host Defense*, R.G. Landes Company, Austin, (1994).
- [61] Garcia-Lara, J., Needham, A.J. and Foster, S.J., "Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction", *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 43, (2005) 311-323.
- [62] Vilmos, P. and Kurucz, E., "Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system" *Immunol. Lett.*, 62, (1998) 59-66.
- [63] Ashida, M. and Brey, P.T., *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*, ed. Brey P., Hultmark D., Chapman and Hall, New York, (1998), p. 135-172.
- [64] Gupta, A.P., *Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods*, Wiley, New York, (1988).
- [65] Lai-Fook, J., "The repair of wounds in the integument of insects", *J. Insect Physiol.*, 12, (1966) 195-226.
- [66] Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C. and Schmidt, O., "The coagulation of insect hemolymph" *Cell Mol. Life Sci.*, 59, (2002) 363-672.
- [67] Bohn, H. and Barwig, B., "Hemolymph clotting in the cockroach *Leucophaea maderae* (Blattaria). Influence of ions and inhibitors; isolation of the plasma coagulogen", *J. Comp. Physiol. B.*, 154, (1984) 457-467.
- [68] Brehélin, M., "Hemolymph coagulation in *Locusta migratoria*: evidence of fibrinogen", *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, (1979) 329-334.
- [69] Theopold, U., Schmidt, O., Söderhall, K. and Dushay, M.S., "Coagulation in arthropods: defense, wound closer and healing", *Trends Immunol.*, 25, (2004) 289-294.
- [70] Marmaras, V.J., Charalambidis, N.D. and Zervas, C.G., "Immune response in insects: The role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization", *Arch Insect Biochem Physiol.*, 31, (1996) 119-133.

- [71] Brey, P.T., Lee, W.J., Yamakawa, M., Koizumi, Y. and Perrot, S., "Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasions and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, (1993) 6275-6279.
- [72] Lee, W.J. and Brey, P.T., "Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*", *Gene* 161, (1995) 199-203.
- [73] Dunn, P.E., Bohnert, T. and Russell, V.W., "Midgut antibacterial defenses of *Manduca sexta* following infection and during metamorphosis", In: *Phylogenetic Perspectives in Immunology: The Insect Host Defense*, ed. Hoffmann, J.A., Janeway, C.A. Jr. and Natori, S. R.G., Landes Company, Austin, (1994), p. 105-111.
- [74] Russell, V.W. and Dunn, P.E., "Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis", *J. Insect Physiol.*, 42, (1996) 65-72.
- [75] Kylsten, P., Kimbrell, D.A., Daffre, S., Samakovlis, Ch. and Hulmark, D., "The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands", *Mol. Gen. Genet.*, 232, (1992) 335.
- [76] Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D.A., Engstrom, Y. and Hultmark, D., "The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity", *Embo J.*, 10, (1991) 163.
- [77] Rosetto, M., Manetti, A.G., Giordano, P.C., Marri, L., Amons, R., Baldari, C.T., Marchini, D. and Dallai, R., "Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*", *Eur. J. Biochem.*, 241 (2), (1996) 330.
- [78] Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, Ch., Hoffmann, J.A. and Letellier, L., "Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*", *J. Biol. Chem.*, 268 (26), (1993) 19239-19245.
- [79] Lockey, T.D. and Ourth, D.O., "Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by a cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae", *Eur. J. Biochem.*, 236, (1996) 263-271.
- [80] Morishima, I., Horiba, T., Iketani, M., Nishioka, E. and Yamano, Y., "Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*", *Dev. Comp. Immunol.*, 19 (1995) 357-363.
- [81] Boman, H.G. , Faye, I., Gudmundsson, G.H., Lee, J.Y. and Lidholm, D.A., "Cell free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins", *Eur J Biochem*, 201, (1991) 23-31.
- [82] Sun, S.-C., Lindstrom, I., Boman, H.G., Schmidt, O. and Faye, I., "Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*", *Eur. J. Biochem.*, 196, (1991) 247-254.

- [83] Sugiyama, M., Kuniyoshi, H., Kotani, E., Taniai, K., Kadono-Okuda, K. et al., "Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins", *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25 (3), (1995) 385-392.
- [84] Asling, B., Dushay, M.S. and Hultmark, D., "Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins", *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25, (1995) 511.
- [85] Carlsson, A. Engstrom, P., Palva, E.T. and Bennich, H., "Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription", *Infect. Immun.*, 59 (9), (1991) 3040-3045.
- [86] Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, Ch. and Hultmark, D., "The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract", *Mol. Gen. Genet.*, 242, (1994) 152.
- [87] Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R.B. and Mauzerall, D., "Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, (1988) 5072-5076.
- [88] Iwai, H., Nakajima, Y., Natori, S., Arata, Y. and Shimada, Y., "Solution conformation of an antibacterial peptide, sarcotoxin IA, as determined by 1H-NMR", *Eur. J. Biochem.*, 217 (2), (1993) 639-644.
- [89] Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J.L., Lambert, J., Reichhart, J.M., Hoffmann, D., Hetru, C. and Hoffmann, J.A., "Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family", *J Biol Chem.*, 25 (1991) 266.
- [90] Dimarcq, J.-L. Hoffmann, D. Meister, M., Buletr, P, et al., "Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity", *Eur. J. Biochem.*, 221, (1994) 201-209.
- [91] Moon, H.J., Lee, S.Y., Kurata, S., Natori, S. and Lee, B.L., "Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*", *J. Biochem.*, 116 (1), (1994) 53-58.
- [92] Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, Ch., Hoffmann, J.A. and Bulet, Ph., "Novel inducible antibacterial peptides from a Hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*", *Biochem. J.*, 300, (1994) 567-575.
- [93] Lowenburger, C., Bulet, P., Charlet, M., Hetru, Ch., Hodgeman, B., et al., "Insect Immunity : Isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*", *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25, (1995) 867.

- [94] Lee, S.Y., Moon, H.J., Kawabata, S., Kurata, S., Natori, S., Lee, B.L., “A sapecin homologue of *Holotrichia diomphalia*: purification, sequencing and determination of disulfide pairs”, *Biol. Pharm. Bull.*, 18, (1995) 457-459.
- [95] Hoffmann, J.A., Hetru, C., “Insect defensins, inducible antibacterial peptides of the insect host defence”, *Immunol. Today*, 13 (10), (1992) 411-415.
- [96] Dimarcq, J.-L., Keppi, E., Dunbar, B., Lambert, J., Reichhart, J.-M., et al., “Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin A”, *Eur. J. Biochem.*, 171 (1-2), (1988) 17-22.
- [97] Wicker, C., Reichhart, J.-M., Hoffmann, D., Hultmark, D., Samakovlis, Ch. and Hoffmann, J.A., “Insect Immunity. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the dipteracin family of immune peptides and expression studies”, *J. Biol. Chem.*, 265, (1990) 22493-22498.
- [98] Ishikawa, M., Kubo, T. and Natori, S., “Purification and characterization of a dipteracin homologue from *Sarcophaga peregrina* (flesh fly)”, *Biochem. J.*, 287, (1992) 573-578.
- [99] Rowley, A.F. and Ratcliffe, N.A., *Insects*, In: *Invertebrate Blood Cells*, ed. Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Vol 2, Academic Press, London, (1981) p 421-488.
- [100] Ribeiro, C. and Brehelin, M., “Insect haemocytes: What type of cell is that?”, *J Insect Physiol.*, 52, (2006) 417-429.
- [101] Gupta, A.P., *Cellular elements in the hemolymph* In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Pergamon Press, New York, (1985), p 401-451.
- [102] Uçkan, F., and Sak, O., “Cytotoxic effect of cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera; Ichneumonidae) larval hemocytes”, *Ekoloji*, 19 (75), (2010) 20-26.
- [103] Silva, J.E.B., Boleli, I.I.C and Simões, Z.L.P., “Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae”, *Braz. J. Biol.*, 62(4A), (2002) 689-699.
- [104] Turnbull, M.W., Martin, S.B. and Webb, B.A., “Quantitative analysis of hemocyte morphological abnormalities associated with *Campoletis sonorensis* parasitization”, *J. Insect Sci.*, 4, (2004) 11-26.
- [105] Brehelin, M. and Zachary, D., *Insect haemocytes: a new classification to rule out controversy*, In: *Immunity in Invertebrates*, ed. Brehelin, M., Springer Verlag, Berlin, (1986), p 36-48.

- [106] Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S. and Amirante, G.A., “Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis”, *Tissue Cell.*, 35, (2003). 243-251.
- [107] Ribeiro, C., Simoes, N. and Brehelin. M., “Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. in vivo and in vitro studies”, *J Insect Physiol.*, 42, (1996) 815-822.
- [108] Schmit, A.R. and Ratcliffe, N.A., “The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae”, *J Insect Physiol.*, 23, (1977) 175–184.
- [109] Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, K. and Yokoo, S., “Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*”, *J Insect Physiol.*, 46, (2000) 1129-1135.
- [110] Ling, E. and Yu. X.Q., “Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells”, *Dev.Comp. Immunol.*, 30, (2006) 301-309.
- [111] Costa, S.C.P., Ribeiro, C., Girard, P.A., Zumbihl, R. and Brehelin, M., “Modes of phagocytosis of Gram- positive and Gram- negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes”, *J Insect Physiol.*, 51, (2005) 39-46.
- [112] Pech, L.L. and Strand, M.R., “Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes”, *J. Cell Science*, 109, (1996) 2053- 2060.
- [113] Tepass, U., Liselotte, I., Fessler, L.I., Aziz, A. and Hartenstein, V., “Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*, *Development*, 120, (1994) 1829-1837.
- [114] Strand, M.R. and Noda, T., “Alterations in the hemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*”, *J. Insect Physiol.*, 37, (1991) 839–850.
- [115] Kanost, M.R., Jiang, H., and Yu, X.-Y. , “Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*”, *Immunol. Rev.*, 198, (2004) 97–105.
- [116] Da Silveira, E.B., Ribeiro, B.M. and Bao, S.N., “Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)”, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 35, (2003) 129-139.
- [117] Ashida, M., Ochiai, M. and Niki, T., “Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of silkworm *Bombyx mori*”, *Tissue&Cell.*, 20, (1988) 599- 610.



- [118] Ashhurst, D.E. and Richards, G., "Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L.", *J. Morph.*, 114, (1964) 247-254.
- [119] Jones, J.C., "Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* (Linnaeus)", *Biol. Bull.*, 132, (1967) 211-221.
- [120] Neuwirth, M., "The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera)", *J. Morph.*, 139, (1973) 105-124.
- [121] Jones, J.C., Hematopoiesis in insects, In: Regulation of hematopoiesis, ed Gordon, A.S., Appleton Press, New York, (1970) p 7-65.
- [122] Akai, H. and Sato S., "An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*", *J. Insect Physiol.*, 17, (1971) 1665-1676.
- [123] Hinks, C.F. and Arnold J.W., "Haemopoiesis in Lepidoptera II: The role of haemopoietic organs", *Can. J. Zool.*, 55, (1977) 1740-1755.
- [124] Beaulaton, J., "Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms", *Biochimie.*, 61, (1979) 157- 164.
- [125] Yamashita, M. and Iwabuchi, K., "*Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures", *J. Insect Physiol.*, 47, (2001) 325-331.
- [126] Gardiner, E.M.M. and Strand M.R., "Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*", *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 43, (2000) 147-164.
- [127] Jones, J.C. and Liu, D.P., "A quantitative study of mitotic divisions of haemocytes of *Galleria mellonella* larvae", *J. Insect Physiol.*, 14, (1968) 1055-1061.
- [128] Fabrick, J.A., Baker, J.E. and Kanost, M.R., "cDNA cloning, purification, properties, and function of a beta-1,3-glucan recognition protein from a pyralid moth, *Plodia interpunctella*", *Insect Biochem Mol. Biol.*, 33, (2003) 579-594.
- [129] Bayne, C.J., "Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates", *BioScience*, 40, (1990) 723-731.
- [130] Ratcliffe, N.A. and Gagen, S.J., "Studies on the in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*", *Tissue Cell*, 9, (1977)73-85.
- [131] Götz, P. and Boman, H.G., Insect immunity. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, vol. 3, ed. Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I., Pergamon Press, Oxford, (1985), p 453-485.
- [132] Richards, E.H. and Edwards, J.P., "Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the

cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation in vivo”, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 49, (2002) 108–124.

[133] Lackie, A.M., “Humoral mechanisms in the immune response of insects to larvae of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda)”, *Parasite Immunol.*, 3, (1981) 201-208.

[134] Lavine, M.D. and Strand, M.R., “Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*”, *J. Insect Physiol.*, 47, (2001) 965-974.

[135] Wiegand, C., Levin, D., Gillespie, J.P., Willott, E., Kanost, M.R. and Trenczek, T., “Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes”, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 45, (2000) 95-108.

[136] Chain, B.M. and Anderson, R.S., “Selective depletion of the plasmatocytes in *Galleria mellonella* following injection of bacteria”, *J. Insect Physiol.*, 28, (1982) 377-384.

[137] Geng, C. and Dunn, P.E., “Hemostasis in larvae of *Manduca sexta*: Formation of a fibrous coagulum by hemolymph proteins”, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 155, (1988) 1060-1065.

[138] Cherbas, L., “The induction of an injury reaction in cultured hemocytes from saturniid pupae”, *J. Insect Physiol.*, 19, (1973) 2011-2023.

[139] Davies, D.H., Hayes, T.K. and Vinson, S.B., “Preliminary characterization and purification of in vitro encapsulation promoting factor: a peptide that mediates insect haemocyte adhesion”, *Dev. Comp. Immunol.*, 12, (1988), 241-253.

[140] Clark, K.D., Pech, L.L. and Strand, M.R., “Isolation and identification of a plasmatocyte- spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*”, *J. Biol. Chem.*, 272, (1997) 23440-23447.

[141] Volkman, B.F., Anderson, M.E., Clark, K.D., Hayakawa, Y., Strand, M.R. and Markley, J.L., “Structure of the insect cytokine peptide plasmatocyte-spreading peptide 1 from *Pseudoplusia includens*”, *J. Biol. Chem.*, 274, (1999) 4493-4496.

[142] Strand, M.R., Hayakawa, Y. and Clark, K.D., “Plasmatocyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs”, *J. Insect. Physiol.*, 46, (2000) 817-824.

[143] Luo, K. and Pang, Y., “*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis”, *J. Insect Physiol.*, 52, (2006) 795–806.

[144] Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F. and Carton, Y., “Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites”, *Eur. J. Cell Biol.*, 68, (1995) 450–456.

- [145] Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F. and Carton, Y., “Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity”, *Nitric Oxide*, 4, (2000) 423–430.
- [146] Jiravanichpaisal, P., Lee, B. and Soderhall, K., “Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization”, *Immunobiology*, 211, (2006) 213–236.
- [147] Gupta, P. and Ferkovich, S.M., “Interaction of calyx fluid and venom from *Microplitis croceipes* (Braconidae) on developmental disruption of the natural host, *Helicoverpa zea*, and two atypical hosts, *Galleria mellonella* and *Spodoptera exigua*”, *J. Insect Physiol.*, 44, (1998) 713-719.
- [148] Lavine, M.D. and Beckage, N. E., “Polydnaviruses: Potent mediators of host insect immune dysfunction”, *Parasitology Today*, 11, (1995) 368-378.
- [149] Penacchio, F., Tranfaglia, A. and Malva, C., “Host-parasitoid antagonism in insects: New opportunities for pest control?”, *Pest Control*, July/August, (2003) 53-56.
- [150] Asgari, S. and Schmidt, O., “Passive protection of eggs from the parasitoid, *Cotesia rubecula*, in the host, *Pieris rapae*”, *J. Insect Physiol.*, 40, (1994) 789-795.
- [151] Hayakawa, Y. and Yazaki, K., “Envelope protein of parasitic wasp symbiont virus, polydnavirus, protects the wasp eggs from cellular immune reactions by the host insect”, *Eur J Biochem.*, 246, (1997) 820-826.
- [152] Asgari, S., Theopold, U., Wellby, C. and Schmidt, O., “A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects”, *Proc Natl Acad Sci*”, 95, (1998) 3690-3695.
- [153] Vinson, S.B., “How parasitoids deal with the immune system of their host: An overview”, *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 13, (1990) 3–27.
- [154] Huang, F., Shi, M., Yan-yan, Y. et al., “Changes in hemocytes of *Plutella xylostella* after parasitism by *Diadegma semiclausum*”, *Arc Insect Biochem.*, 70(3), (2009) 177-187.
- [155] Prevost, G., Eslin, P., Doury, G., Moreau, S.J.M. and Guillot, S., “*Asobara*, braconid parasitoids of *Drosophila* larvae: unusual strategies to avoid encapsulation without VLPs”, *J. Insect Physiol.*, 51, (2005) 171–179.
- [156] Stoltz, D.B. and Guzo, D., “Apparent hemocytic transformations associated with parasitoid-induced inhibition of immunity in *Malacosoma disstria* larvae”, *J. Insect Physiol.*, 32, (1986) 377–388.
- [157] Davies, D.H., Strand, M.R. and Vinson, S.B., “Changes in differential hemocyte count and in vitro behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Campoletis sonorensis* polydnavirus”, *J. Insect Physiol.*, 33, (1987) 143–153.

- [158] Rizki, R.M. and Rizki, T.M., “Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity”, *P. Natl. Acad. Sci.*, 87 (8) (1990) 388–8392.
- [159] Webb, B.A. and Luckhart, S., “Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*”, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 26 (1994) 147–163.
- [160] Luckhart, S. and Webb, B.A., “Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression”, *Dev. Comp. Immunol.*, 20(1), (1996) 1-21.
- [161] Asgari, S. and Schmidt, O., “Is cell surface calreticulin involved in phagocytosis by insect hemocytes?”, *J. Insect Physiol.*, 49, (2003) 545-550,
- [162] Hoch, G. and Schopf, A., “Effect of *Glyptapanteles liparidis* (Hym.: Braconidae) parasitism, polydnavirus, and venom on development of microsporidia-infected and uninfected *Lymantria dispar* (Lep.: Lymantriidae) larvae”, *J. Invertebr. Pathol.*, 77, (2001) 37-43.
- [163] Digilio, M.C., Pennacchio, F. and Tremblay, E., “Host regulation effects of ovary fluid and venom of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae)”, *J. Insect Physiol.*, 44, (1998) 779-784.
- [164] Masler, E.P. and Kovaleva, E.S., “Inhibition of larval growth in the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by venom from the parasitic wasp *Microbracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae)”, *J. Entomol. Sci.* 34(4), (1999) 435-444.
- [165] Strand, M.R. and Dover, B.A., “Developmental disruption of *Pseudoplusia includens* and *Heliothis virescens* larvae by the calyx fluid and venom of *Microplitis demolitor*”, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 18(3), (1991) 131-145.
- [166] Asgari, S., Zhang, G, Zareie, R. and Schmidt, O., “A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph”, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 33, (2003) 1017-1024.
- [167] Zlotkin, E., Toxins derived from arthropod venoms specifically affecting insects. In: *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, ed. Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., 10, Pergamon Press, New York, (1985), p.499-546.
- [168] Corzo, G., Villegas, E., Gómez-Lagunas, F., Possani, L.D., Belokoneva, O.S. and Nakajima, T., “Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins”, *J. Biol. Chem.*, 277(26), (2002) 23627-23637.
- [169] Adams, M. and Liberstat F., “Venom cocktails and the orchestration of prey paralysis”, 6th Congress of International Society for Neuroethology, Bonn, (2001).

- [170] Uçkan, F., Sinan, S., Savaşçı, Ş., and Ergin, E., “Determination of venom components from the endoparasitoid wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)”, *Ann Entomol. Soc. Am.*, 97(4), (2004) 775-780.
- [171] Vinson, S.B., The behavior of parasitoids. In: *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, ed. Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., 9, Pergamon Press, New York, (1985), p. 417-469.
- [172] Libersat, F., “Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey”, *J. Comp. Physiol. A*, 189, (2003) 497-508.
- [173] Zhang, D., Dahlman, D.L. and Järlfors, U.E., “Effects of *Microplitis croceipes* teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation”, *J. Insect Physiol.*, 43(6), (1997) 577-585.
- [174] Kitano, H., “The role of *Apanteles glomeratus* venom in the defensive response of its host, *Pieris rapae crucivora*”, *J. Insect Physiol.*, 32(4), (1986) 369-375.
- [175] Strand, M.R. and Pech L.L., “*Microplitis demolitor* polydnavirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudoplusia includens*”, *J. Gen. Virol.*, 76, (1995) 283–291.
- [176] Suzuki, M. and Tanaka, T., “Virus-like particles in venom of *Meteorus pulchricornis* induce host hemocyte apoptosis”, *J. Insect Physiol.*, 52 (2006) 602–613.
- [177] Eslin, P. and Prévost, G., “Variation in *Drosophila* concentration of haemocytes associated with different ability to encapsulate *Asobara tabida* larval parasitoid”, *J. Insect Physiol.*, 42, (1998) 549-555.
- [178] Teramoto, T. and Tanaka, T., “Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*”, *J. Insect Physiol.*, 50, (2004) 1103–1111.
- [179] Yu, R., Chen, Y., Chen, X., Huang, F., Lou, Y. and Liu, S., “Effects of venom/calyx fluid from the endoparasitic wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro”, *J. Insect Physiol.*, 53, (2007) 22-29.
- [180] Mochiah, M.B., Ngi-Song, A.J, Overholt, W.A. and Botchey, M., “Variation in total and differential haemocyte count of encapsulation sensitivity of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitized by two biotypes of *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) and larval growth responses”, *Environ. Entomol.* 32, (2003) 247-255.
- [181] Ibrahim, A.M.A. and Kim, Y., “Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth, *Plutella xylostella*”, *J. Insect Physiol.*, 52, (2006) 943–950.

- [182] Gauld, I.D., “Evolutionary patterns of host utilization by ichneumonoid parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae and Braconidae)”, *Biol. J. Linnean Soc.*, 35, (1988) 351-377.
- [183] Pech, L.L. and Strand, M.R., “Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells”, *J. Insect Physiol.*, 46, (2000) 1565-1473.
- [184] Le, N.T., Asgari, S., Amaya, K., Tan, F.F. and Beckage, N.E., “Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*”, *J. Insect Physiol.*, 49, (2003) 533-543.
- [185] Terahara, K., Takahashi, K.G. and Mori, K., “Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*”, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, (2003) 521-528.
- [186] Richards, E.H., and Dani, M.P.,. Venom-induced apoptosis of insect hemocytes, In: *Recent Advances in the Biochemistry, Toxicity, and Mode of Action of Parasitic Wasp Venoms*, ed. Rivers, D.B., Yoder, J.A., Research SignPost, Kerala, India, (2007), p 19-36.
- [187] Rivers, D.B., Genco, M. and Sanchez, R.A., “In vitro analysis of venom from the wasp *Nasonia vitripennis*: susceptibility of different cell lines and venom-induced changes in plasma membrane permeability”, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 35, (1999) 102-110.
- [188] Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P., “Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances”, *Int. Rev. Cytol.*, 97, (1985) 186–350.
- [189] Shapiro, M., “Changes in the hemocyte population of the wax moth, *Galleria mellonella*, during wound healing”, *J. Insect Physiol.*, 14, (1968) 1725–1733.
- [190] Arnold, J.W. and Hinks, C.F., “Haemopoiesis in Lepidoptera. I. A note on the multiplication of spherule cells and granular haemocytes”, *Can. J. Zool.*, 61, (1976) 275–277.
- [191] Li, Y., Lu, J.F., Feng, C.J., Ke, X., Fu, W.J. “Role of venom and ovarian proteins in immune suppression of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae parasitized by *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid”, *The Authors Insect Science*, 14, (2007) (93-100).
- [192] Parkinson, N., Richards, E.H., Conyers, C., Smith, I. and Edwards, J.P., “Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of cDNA encoding a venom protein”, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, (2002) 729-735.

- [193] Öder, E., Bal arısı hastalıkları, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, (1983), s.74.
- [194] Beroza, M., Chemicals controlling insect behavior, Academic Press, New York, (1970).
- [195] Kansu, İ.A. ve Uğur, A., “*Pimpla turionellae* (L.) (Hym., Ichneumonidae) ile konukçusu bazı lepidopter pupaları arasındaki biyolojik ilişkiler üzerinde araştırmalar”, *Doğa Bilim Dergisi*, D2, **8(2)**, (1984) 160-173.
- [196] Kılınçer, N., “Untersuchungen über die hämocytaire abwehrreaktion der puppe von *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera) und über ihre hemmung durch den puppenparasiten *Pimpla turionellae* L. (Hym., Ichneumonidae)”, *Z. ang. Ent.*, 78, (1975) 340-370.
- [197] Osman, S.E., “Der Einfluß der imaginalernährung und der begattung auf die sekretproduktion der weiblichen genitalanhangsdrüsen und auf die eireifung von *Pimpla turionellae* L. (Hym., Ichneumonidae)”, *Z. ang. Ent.*, 85, (1978) 113-122.
- [198] Emre, İ. ve Yazgan, Ş., “Besin bileşenlerinin *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)’nın üremesi üzerine etkileri”, *Doğa-Tr. J. Biology*, 14, (1990) 96-104.
- [199] Yazgan, Ş., “A meridic diet and quantitative effects of Tween 80, fatty acid mixtures and inorganic salts on development and survival of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L.”, *Z. Angew. Entomol.*, 91, (1981) 433-441.
- [200] Emre; İ., “Meridik bir besinin *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) ergin dişilerinin yumurta verimine etkisi”, *DOĞA TU Biyol. D.*, 12(2), (1988) 101-105.
- [201] Nurullahoğlu, Z.Ü. ve Aksoylar, M.Y., “Besinsel yağ asitlerinin *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) ergin dişilerinin yağ asidi bileşimine etkileri”, XIV. Ulusal Biyoloji Kongresi, Samsun, (1998), 313-322.
- [202] Aktümsek, A. ve Aksoylar, M.Y., “*Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera, Ichneumonidae)’nın yağ asidi bileşimi”, *DOĞA TU Biyol. D.*, 11(1), (1987) 10-18.
- [203] Yanıkoğlu, A., “Bazı karbohidratların *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)’nın glikojen sentezine etkileri”, *Cumhuriyet Üniv. Fen Bil. Derg.*, 3(2), (1985) 205-210.
- [204] Führer, E. and Willers, D., “The anal secretion of the endoparasitic larva *Pimpla turionellae*: sites of production and effects”, *J. Insect Physiol.*, 32, (1986) 361-367.
- [205] Uçkan, F. ve Gülel, A., “Endoparazitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişilerinde zehir aparatının yapısı ve zehirinin

başlıca kimyasal grubunun tayini”, X. Ulusal Biyoloji Kongresi, Erzurum, (1990) 73-83.

[206] Uçkan, F., “The morphology of the venom apparatus and histology of venom gland of *Pimpla turionella* (L.) (Hym; Ichneumonidae) females”, *Tr. J. Zool.*, 23(4), (1999) 461-466.

[207] Büyükgüzel, K. ve Yazgan, Ş., “Bazı antibiyotiklerin endoparazitoit *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)’nın yaşama ve gelişimine etkileri”, *Tr. J. Zool.*, 20, (1996) 1-7.

[208] Sulanç, M. ve Emre, İ., “İnorganik tuzların erkek *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvalarının gelişmesine ve sentezledikleri protein miktarına kalitatif ve kantitatif etkileri”, *Doğa-Tr. J. Zoology*, 16, (1992) 92-100.

[209] Büyükgüzel, K., “Positive effects of some gyrase inhibitors on survival and development of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet”, *J. Econ. Entomol.*, 94(1), (2001) 21-26.

[210] Büyükgüzel, K. and Yazgan, Ş., “Effects of antimicrobial agents on the survival and development of larvae of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) reared on an artificial diet”, *Turk. J. Zool.*, 26, (2002) 111-119.

[211] Büyükgüzel, K., “Effects of some DNA gyrase inhibitors on the survival and development of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet”, *Turk. J. Zool.*, 26, (2002) 121-126.

[212] Özalp, P. ve Emre, İ., “Karbohidratların *Pimpla turionellae* L. ergin dişilerinde total glikojen ve protein miktarına etkileri”, *Tr. J. Zoology*, 22, (1998) 15-19.

[213] Şeker, D.A. ve Yanıkoğlu, A., “*Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)’nın açlık, beslenme, parazitlenme ve yaşlılık durumlarında glikojen seviyesindeki değişimler”, *Tr. J. Zool.*, 23(Ek sayı 1), (1999) 289-296.

[214] Yanıkoğlu, A., “*Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)’nın başkalaşımı sırasında glikojen miktarındaki değişimler”, *Cumhuriyet Üniv. Fen Bil. Derg.*, 3(1), (1985) 57-68.

[215] Büyükgüzel, K., “Effects of some antimicrobial agents on the total protein content of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)”, *Turk. J. Zool.*, 26, (2002) 101-109.

[216] Yanıkoğlu, A., “Düşük sıcaklığın *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) pupalarının glikojen seviyelerine etkisi”, *Cumhuriyet Üniv. Fen Bil. Derg.*, 13, (1990) 53-66.



- [217] Adıyaman, N. ve Aktümsek, A., “Pup ve ergin evrede uygulanan düşük sıcaklığın *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişilerinin yumurta verimine etkileri”, *Tr. J. Zool.*, 20(Ek Sayı), (1996) 1-5.
- [218] Kalyoncu, L. ve Aksoylar, M.Y., “*Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişi pup ve erginlerinin total lipid, total yağ asidi ve yağ asidi bileşimine tedrici azalan sıcaklığın etkileri”, XIV. Ulusal Biyoloji Kongresi, Samsun, 3, (1998) 323-333.
- [219] Nurullahoğlu, Z.Ü. ve Aksoylar, M.Y., “Düşük sıcaklığın *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişi pup ve erginlerinin total lipid, total yağ asidi ve yağ asidi bileşimine etkileri”, *Tr. J. Zoology*, 21, (1997) 295-301.
- [220] Ortel, J. and Vogel, W.R., “Effects of lead and cadmium on oxygen consumption and life expectancy of the pupal parasitoid, *Pimpla turionellae*”, *Entomol. exp. appl.*, 52(1), (1989) 83-88.
- [221] Ortel, J., “Effects of lead and cadmium on chemical composition and total water content of the pupal parasitoid, *Pimpla turionellae*”, *Entomol. Exp. Appl.*, 59(1), (1991) 93-100.
- [222] Ortel, J., “Accumulation of Cd and Pb in successive stages of *Galleria mellonella* and metal transfer to the pupal parasitoid *Pimpla turionellae*”, *Entomol. Exp. Appl.*, 77, (1995) 89-97.
- [223] Erol, T. ve Kılınçer, N., “Bazı insektisitlerin pupa asalağı *Pimpla turionellae* L. (Hym.: Ichneumonidae)’ye etkileri üzerine araştırmalar”, Türkiye I. Biyolojik Mücadele Kongresi, Adana, (1986), 123-137.
- [224] Özkan, F. ve Emre, İ., “Oral yolla alınan organofosfatlı insektisit malathion’un *Pimpla turionellae* L. dişilerinin yaşam süresi, yumurta verimi ve açılımına etkisi”, *Tr. J. Zoology*, 21, (1997) 309-313.
- [225] Sak, O., Uçkan, F. and Ergin, E., “Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae)”, *Belg. J. Zool.*, 136 (1): (2006) 53-58.
- [226] Yanıkoğlu, A. ve Bilaloğlu, R., “2,4-D’nin *Pimpla turionellae* L.’nin yumurta verimi, yumurta açılımı, gelişme ve eşey oranına etkileri”, IX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Sivas, 1, (1988) 403-408.
- [227] Yanıkoğlu, A., “2,4-D’nin *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) dişilerinin glikojen seviyelerine etkisi”, Cumhuriyet Üniv. Fen Bil. Derg., 8(1), (1989) 27-34.
- [228] Ergin E., Uçkan F., Rivers D.B. and Sak O., “In vivo and in vitro activity of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae)”, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 61, (2006) 87-97.

- [229] Bronskill, J.F., “A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae), *J. Lep. Soc.*, **15**(2), (1961) 102-104.
- [230] Kosmider , B., E. Zyner, R. Osiecka, J. Ochocki (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.
- [231] Cendoroglo, M., Jaber, B., Balakrishnan, L., Perianayagam, V. S., King, M. and Pereira, B.J.G., “Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia”, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10, (1999) 93-100.
- [232] Richards, E.H. and Dani, M. P., “Biochemical isolation of an insect haemocyte anti-aggregation protein from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and identification of its gene”, *J. Insect Physiol.*, 54, (2008) 1041-1049.
- [233] SPSS Inc., SPSS 15.0 Statistics. SPSS, Chicago, IL, (1999).
- [234] Vinson, S.B. and Iwantsch, G.F., “Host Suitability for Insect Parasitoids”, *Ann. Rev. Entomol.*, 25, (1980) 397.
- [235] Arnold, J.W. and Hinks, C.F., “Haemopoiesis in Lepidoptera. III. A note on the multiplication of spherule cells and granular haemocytes”, *Can. J. Zool.*, 61, (1983) 275–277.
- [236] Nittono, Y., “Studies on the blood cells in the silkworm, *Bombyx mori* L.”, *Bulletin of the Sericulture Experiment Station Tokyo*, 16, (1960) 171–266.
- [237] Ayvalı, C., “Metamorfoz sırasında *Agrotis ipisilon* (Hufn.) (Lepidoptera: Noctuidae) hemositleri üzerine araştırmalar”, Ankara üniversitesi, ziraat fakültesi yayınları, 1149, Bilimsel araştırma ve incelemeler 636, Ankara 1989, sayfa 1-20.
- [238] Beetz, S., Holthusen, T.K., Koolman, J. and Trenczek, T., “Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*”, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 67, (2008) 63–75
- [239] Kenan, B., Uçkan, F., Ergin, E. and Rivers, D.B., Morphological and biochemical changes in cultured cells induced by venom from the endoparasitoid, *Pimpla turionellae*, In: Recent Advances in the Biochemistry, Toxicity, and Mode of Action of Parasitic Wasp Venoms, ed. Rivers D.B. and Yoder, J., Research Signpost, Kerala, India, (2007), p. 75-92.
- [240] Hoffman, D.R. and Jacobson, R.S., “Allergens in Hymenoptera venom XII: How much protein is in a sting?”, *Ann. Aller.*, 52, (1984) 276-278.
- [241] Coudron, T.A., Wright, M.M.K., Puttler, B., Brandt, S.L. and Rice, W.C., “Effect of the ectoparasite *Necremnus breviramulus* (Hymenoptera: Eulophidae) and

its venom on natural and factitious hosts”, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 93(4), (2000) 890-897.

[242] Drenth, D., “Susceptibility of different species of insects to an extract of the venom gland of the wasp *Microbracon hebetor* (Say)”, *Toxicon*, 12, (1974) 189-192.

[243] Rivers, D.B., Hink, W.F. and Denlinger, D.L., “Toxicity of the venom from *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward fly hosts, nontarget insects, different developmental stages, and cultured cells”, *Toxicon*, 31(6), (1993) 755-765.

[244] Skinner, W.S., Dennis, P.A. and Quistad, G.B., “Partial characterization of toxins from *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Braconidae)”, *J. Econ. Entomol.*, 83(3), (1990) 733-736.

[245] Beckage, N.E., “Modulation of immune responses to parasitoids by polydnviruses”, *Parasitol.*, 116, (1998) 57-64.

[246] Asgari, S., Hellers, M. and Schmidt, O., “Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnvirus gene”, *J. Gen. Virol.*, 77, (1996) 2653-2662.

[247] Parkinson, N.M. and Weaver, R.J., “Noxious components of venom from pupa-specific parasitoid *Pimpla hypochondriaca*”. *J. Inverteb. Pathol.* 73, (1999) 74-83.

[248] Marris, G.C., Bell, H.A., Naylor, J.M. and Edwards, J.P., “The role of *Pimpla hypochondriaca* venom in the suppression of pupal Noctuid host immunity”, *Entomol. Exp. App.*, 93, (1999) 291-298.

[249] Stettler, P., Trenczek, T., Wyler, T., Pfister-Wilhelm, R. and Lanzrein, B., “Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*”, *J. Insect Physiol*, 44, (1998).817-831,

[250] Wu, M.-L., Gong-yin, Y., Jia-ying, Z., Xue-xin, C. and Cui, H., “Isolation and characterization of an immunosuppressive protein from venom of the pupa-specific endoparasitoid *Pteromalus puparum*”, *J. Invertebr. Pathol.*, 99, (2008) 186-191.

[251] Trump, B.F. and Berezsky, I.K., “Calcium-mediated cell injury and cell death”, *FASEB Journal*, 9, (1995) 219-228.

[252] Nicotera, P., Hartzell, P., Davis, G. and Orrenius, S., “The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca<sup>2+</sup> is mediated by activation of a non-lysosomal proteolytic system”, *FEBS Letters*, 209, (1986) 139.

- [253] Phelps, P.C., Smith, M.W. and Trump, B.F., “Cytosolic ionized calcium and bleb formation following acute cell injury of cultured rabbit renal tubular cells”, *Laboratory Investigations*, 60, (1989) 630-642.
- [254] Troyer, D.A., Kreisberg, J.I. and Venkatachalam, M.A., “Lipid alterations in LLC-PK1 cells exposed to mercuric chloride”, *Kidney International*, 29, (1986) 530-538.
- [255] Perez, J.F., Chemello, M.E., Liprandi, F., Ruiz, M.C. and Michelangeli, F., “Oncosis in MA104 cells is induced by rotovirus infection through an increases in intracellular Ca<sup>+2</sup> concentration”, *Virology*, 252, (1998) 17-27.
- [256] Zhang, Z., Ye, G., Cai, J. and Hu, C., “Comparative venom toxicity between *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward the hemocytes of their natural hosts, non-target insects and cultured insect cells”, *Toxicon*, 46, (2005) 337-349.
- [257] De Graaf, D.C., Aerts, M., Brunain, M., Desjardins, C.A., Jacobs, F.J., Werren, J.H. and Devreese, B., “Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies”, *Insect Mol. Biol.*, 19, (2010) 11–26.
- [258] Diaz, C., Valverde, L., Brenes, O., Rucavado, A. and Gutierrez, J.M., “Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells”, *J. Cell. Biochem.*, 94, (2005) 520–528
- [259] Tanjoni, I., Weinlich, R., Della-Casa, M. S., Clissa, P. B., Saldanha-Gama, R. F., Freitas, M. S., Barja-Fidalgo, C., Amarante-Mendes, G. P. and Moura-da-Silva, A. M., “Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells”, *Apoptosis*, 10, (2005) 851–861.
- [260] Kiuchi, T., Aoki, F., and Nagata, M., “Effects of high temperature on the hemocyte cell cycle in silkworm larvae”, *J. Insect Physiol.*, 54 (2), (2008), 454-461.
- [261] Pennacchio, F., Falabella, P. and Vinson, S.B., “Regulation of *Heliothis virescens* prothoracic glands by *Cardiochiles nigriceps* polydnavirus”, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 38, (1998) 1–10.
- [262] Zhang, D., Dahlman, D.L. and Gelman, D., “Juvenile hormone esterase activity and ecdysteroid titer in *Heliothis virescens* larvae injected with *Microplitis croceipes* teratocytes”, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 20, (1992) 231– 242.
- [263] Lanzrein, B., Hammock, B., “Degradation of juvenile hormone III in vitro by non-parasitized and parasitized *Spodoptera exigua* (Noctuidae) and by the endoparasitoid *Chelonus inanitus* (Braconidae)”, *J. Insect Physiol.*, 41, (1995) 93–100.

- [264] Wago, H. and Tanaka, T., “Synergistic effects of calyx fluid and venom of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) on the granular cells of *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae)”, *Zool. Sci.*, 6, (1989) 691–696.
- [265] Zhang, G., Schmidt, O. and Asgari, S., “A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation”, *Dev. Comp. Immunol.*, 30, (2006).756-764.
- [266] Choi, J.Y., Whitten, M.M.A., Cho, M.Y., Lee, K.Y., Kim, M.S., Ratcliffe, N.A. and Lee, B.L., “Calreticulin enriched as an early stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae”, *Dev. Comp. Immunol.*, 26, (2002) 335-343.
- [267] Cho, J.H., Homma, K., Kanegasaki, S. and Natori, S., “Activation of human neutrophils by a synthetic antimicrobial peptide KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub>, via cell surface calreticulin”, *Eur J. Biochem*, 266, (1999) 878-885.
- [268] Keenan, B., Uçkan, F., Ergin, E. and Rivers, D.B., “*Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) zehirinin konak hücrelerine morfolojik ve biyokimyasal etkileri”, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Zooloji, Trabzon, (2008) 217-218.
- [269] Nappi, A.J. and Ottaviani, E., “Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates”, *BioEssays*, 22, (2000) 469-480.
- [270] Riley, P.A., “Melanin”, *Int J Biochem Cell Biol*, 29, (1997) 1235-1239.
- [271] Carton, Y. and Nappi, A.J., “*Drosophila* cellular immunity against parasitoids” *Parasitol. Today*, 13, (1997) 218-227.
- [272] Vass, E., Nappi, A.J. and Carton, Y., “Alterations in the activities of tyrosinase, N-acetyltransferase, and tyrosine aminotransferase in immune reactive larvae of *Drosophila melanogaster*”, *Dev Comp Immunol*, 17, (1993) 109-118.
- [273] Nappi, A.J., Carton, Y. and Frey, F., “Parasite-induced enhancement of hemolymph tyrosinase activity in a selected immune reactive strain of *Drosophila melanogaster*”, *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 18, (1991) 159-168.
- [274] Beckage, N.E., Metcalf, J.S., Nesbit, D.J., Schleifer, K.W., Zetlan, S.R. and Buron, I., “Host hemolymph monophenoloxidase activity in parasitized *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by wasp polydnavirus”, *Insect Biochem.*, 20 (3), (1990) 285-294.
- [275] Yin, L.H., Wang, C.Z., Qin, J.D., “Effect of the endoparasitoid *Campoletis chloridiae* on phenoloxidase activity in *Helicoverpa armigera* hemolymph”, *Chin. Sci. Bull.*, 46, (2001) 1303.