



T.C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EŞEK ARISI (*VESPA CRABRO*) YUVASININ ÖZÜTLERİNİN  
*AUTOGRAPHA CALIFORNICA* NÜKLEAR POLİHEDROZİS  
VİRÜSÜNÜN *SPODOPTERA FRUGIPERDA* HÜCRE  
KÜLTÜRÜNDEKİ VİRÜS REPLİKASYONUNA ETKİLERİ**

**ALEV ÇALDAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**ORDU 2020**

**T.C.**  
**ORDU ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**EŞEK ARISI (*VESPA CRABRO*) YUVASININ ÖZÜTLERİNİN *AUTOGRAPHA CALIFORNICA* NÜKLEAR POLİHEDROZİS VİRÜSÜNÜN *SPODOPTERA FRUGIPERDA* HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ VİRÜS REPLİKASYONUNA ETKİLERİ**

**ALEV ÇALDAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ORDU 2020**

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



**ALEV ÇALDAŞ**

**Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün B-1817 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

# EŞEK ARISI (*VESPA CRABRO*) YUVASININ ÖZÜTLERİNİN *AUTOGRAPHA CALIFORNICA* NÜKLEAR POLİHEDROZİS VİRÜSÜNÜN *SPODOPTERA FRUGIPERDA* HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ VİRÜS REPLİKASYONUNA ETKİLERİ

ALEV ÇALDAŞ

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 61 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ÖMER ERTÜRK)

Eşek arı yuvaları birçok farklı bitki türü, arının tükürük salgısı ve sekonder bileşenlerden meydana gelir. Bu çalışmada da, arı yuvası özütlerinin, *Autographa californica* multikapsid nükleer polihedrozis virüsünün (AcMNPV), *Spodoptera frugiperda* (Sf) hücre kültürleri içerisindeki replikasyonları üzerindeki etkileri incelenmiş, antiviral özellikleri belirlenmiştir ve yuvaların içerdiği biyolojik maddeler tespit edilmiştir. Çalışmada Trabzon ili Araklı ilçesi Yıldızlı köyünden bir evin çatısından alınan eşek arısı (*Vespa crabro*) yuvası özütleri kullanılmıştır. Hücre canlılığı ve sitotoksitesite analizi için Sf9 hücre hattı kullanılarak MTT analizi ile in vitro sitotoksitesite testleri yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, arı yuvasının antiviral analizi yapılarak virüsün sitopatik etkileri de değerlendirilmiştir ve böylece arı yuvasının virüs konsantrasyon tayini yapılmıştır. Arı yuvası ekstraktlarının virüsün protein sentezi üzerine olan etkileri SDS-PAGE yöntemi ile, pUC18 plazmid DNA'sı ile etkileşimi analizi de agaroz jel tekniği ile incelenmiştir. Gaz kromatografi kütle spektrometre (GC-MS) sistemi ile biyoaktif bileşenlerin analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda; hücre canlılığında arı yuvası ekstraktına uygulanan 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı ve Sf9 hücreleri için oldukça toksik olduğu gözlemlenmiştir. Belirtilen konsantrasyonların doz artışına bağlı olarak da sitotoksitesiteyi artırdığı görülmüştür. Arı yuvası ekstraktlarının sitopatik değişimlere olan etkileri ise, etanol, aseton ve petrol eteri ekstraktları 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında Sf hücrelerine uygulanarak incelenmiştir. Bu incelemenin sonucunda, 50 µg/ml konsantrasyonunun 25 µg/ml konsantrasyonuna göre bakulovirüsün Sf hücreleri üzerindeki sitopatik etkilerini daha fazla azalttığı ve enfeksiyonu geciktirdiği gözlemlenmiştir. Virüs konsantrasyon analizi sonucuna göre; virüs sayısında %75 oranında en yüksek azaltıcı etki gösteren yuva, aseton ekstresinin 50 µg/ml konsantrasyonu olduğu, %33.33 oranında en düşük azaltıcı etkiyi gösteren yuvanın ise etanol ekstresinin 25 µg/ml konsantrasyonu olduğu tespit edilmiştir. Arı yuvası ekstraktlarında virüsün protein sentezi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için arı yuvası numunesinin aseton ve petrol eteri ekstraktları 25 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanmıştır ve bu örneklerde polihidrin proteini gözlemlenmiştir. Fakat diğer konsantrasyonlarda polihidrin proteini tespit edilememiştir. Arı yuvası ekstraktının pUC18 plazmid DNA'sı ile etkileşimi sonucunda farklı konsantrasyonlarda yuva ekstraktı uygulanmıştır ve artan konsantrasyona bağlı olarak yuva ekstraktının DNA hasarı için tamir edici bir özelliğinin olduğu tespit edilmiştir. GC-MS sistemi ile biyoaktif bileşenlerin analizi sonucunda arı yuvası ekstresinde en yüksek % alana sahip (35.87) olan bileşen (Z) 9-Tricosane, en az % alana (1.65) sahip bileşen ise (cis)-2-nonadecene olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Arı yuvası, Bakulovirüs, Hücre kültürü, *Spodoptera frugiperda*, *Vespa crabro*.

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF HORNET ( *VESPA CRABRO*) NEST EXTRACTS ON THE REPLICATION OF *AUTOGRAPHA CALIFORNICA* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS IN *SPODOPTERA FRUGIPERDA* CELL CULTURE

ALEV ÇALDAŞ

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

MASTER THESIS, 61 PAGES

(SUPERVISOR: DOÇ. DR. ÖMER ERTÜRK)

Wasp nests are composed of many different plant species, saliva secretion of the bee and secondary components. In this study, antiviral properties of the effects of extracts in bee nests on the replications of *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) in *Spodoptera frugiperda* (Sf) cell cultures were determined and the biological substances contained in the nests were determined. In the study, extracts of wasp (*Vespa crabro*) nest taken from the roof of a house in Araklı district, Yıldızlı village, Trabzon province were used. For cell viability and cytotoxicity analysis, in vitro cytotoxicity tests were performed with MTT analysis using the Sf9 cell line and the results obtained were statistically evaluated. In addition, the antiviral analysis of the bee nest was performed and the cytopathic effects of the virus were also evaluated and thus the virus concentration of the bee nest was determined. The effects of bee nest extracts on protein synthesis of the virus were analyzed by SDS-PAGE method, and the analysis of the interaction with pUC18 plasmid DNA was investigated by agarose gel technique. Bioactive components were analyzed with gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) system. As a result of the analysis; It has been observed that 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml concentrations applied to bee nest extract in cell viability decrease the cell viability depending on the dose and are highly toxic for Sf9 cells. It was observed that the concentrations indicated increased cytotoxicity with increasing dose. The effects of bee nest extracts on cytopathic changes were investigated by applying ethanol, acetone and petroleum ether extracts at concentrations of 25 and 50 µg/ml to the Sf cell. As a result of this examination, it was observed that 50 µg/ml concentration reduced cytopathic effects of baculovirus on Sf cell more and delayed infection compared to 25 µg/ml concentration. According to the virus concentration analysis results; It was determined that the nest showing the highest reducing effect by 75% in the number of viruses was the acetone extract concentration of 50 µg / ml, and the slot showing the lowest reducing effect at 33% was the 25 µg/ml concentration of ethanol extract. In order to determine the effects of the virus on protein synthesis in bee nest extracts, acetone and petroleum ether extracts were applied to the bee nest sample at 25 µg/ml concentrations and polyhydric protein was observed in these samples. However, other concentrations of polyhydric protein could not be detected. As a result of the interaction of bee nest extract with pUC18 plasmid DNA, different concentrations of nest extract were applied and it was determined that the nest extract had a repairing property for DNA damage due to the increasing concentration. As a result of the analysis of bioactive components with the GC-MS system, the component with the highest area (35.87) % in bee nest extract was determined as (Z) 9-Tricosane, and the component with at least (1.65) % area was determined as (cis)-2-nonadecene.

**Keywords:** Bee nest, Baculovirus, Cell culture, *Spodoptera frugiperda*, *Vespa crabro*.

## TEŞEKKÜR

Tüm alıőmalarım boyunca her zaman bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren lisansüstü eğitimim boyunca tez konumun seimi, alıőmalarımın yürütülmesi sırasında deneyim ve bilgilerini benimle paylaőan danıőman hocam Doç. Dr. Ömer ERTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalıőmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın hocam Arő. Gör. Dr. Ceren BREK KASURKA' ya en içten teőekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda, hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teőekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	IV
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	V
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VII
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	IX
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	X
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1 Böcek virüsleri.....	1
1.2 Bakulovirüsler.....	1
1.2.1 Bakulovirüslerin Genel Özellikleri.....	1
1.2.2 Bakulovirüslerin Kökeni.....	2
1.2.3 Bakulovirüslerin Genetiği ve Morfolojisi.....	2
1.2.4 Bakulovirüslerin Hücre Kültürlerindeki Replikasyonu.....	5
1.2.5 Bakulovirüsün DNA Virüs Modeli ve Çalışma Kolaylığı.....	7
1.3 Antiviral İlaçlar ve Etkileri.....	8
1.4 Aşılar ve Nüfus Sağlığı.....	10
1.5 Arılar.....	10
1.5.1 Vespidae (Yaban Arıları).....	11
1.5.2 <i>Vespa crabro</i> (Avrupa Hornet).....	11
1.5.2.1 Avrupa Hornet Yuvası.....	11
1.5.3 Ülkemizde Vespidae.....	12
1.6 Arı Yuvası Özütleri ve Hücre Kültürü Çalışmanın Önemi.....	13
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	16
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	17
3.1 Hücre Hattı ve Virüs Üretimi.....	17
3.1.1 Hücre Hattı.....	17
3.1.2 Hücre Büyütülmesi ve Alt Kültür Yapılması.....	17
3.1.3 Virüs Üretimi.....	17
3.2 Arı Yuvası Materyali Temini ve Ekstraktların Hazırlanması.....	18
3.3 Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Analizi.....	19
3.4 İstatistiksel analizi.....	20
3.5 Arı Yuvasının Antiviral Analizi ve Virüsün Sitopatik Etkilerinin Belirlenmesi.....	21
3.6 Arı Yuvasının Virüs Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması.....	22
3.7 Arı Yuvası Ekstraktlarının Virüsün Protein Sentezi Üzerine Olan Etkilerinin İncelenmesi, Protein Numunelerinin Hazırlanması ve SDS-PAGE.....	23
3.8 Arı Yuvası Ekstraktının pUC18 Plazmid DNA'sı İle Etkileşimi Analizi.....	24
3.9 Gaz Kromatografi Kütle Spektrometre (GC-MS) Sistemi İle Biyoaktif Bileşenlerin Analizi.....	24
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	25
4.1 Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Tahlili.....	25
4.2 Arı Yuvası Numunesinden Elde Edilen Üç Farklı Çözeltinin Sitopatik Değişimlere Olan Etkileri.....	28

4.3 Arı Yuvasının Virüs Üretimi Üzerine Etkilerinin Tayini .....	36
4.4 Virüsün Protein Sentezi Üzerine Olan Etkileri .....	38
4.5 Arı yuvası ekstraktlarının Hidroksil Radikal Aracılı DNA Hasarı Üzerine Etkisi.....	40
4.6 GC-MS Analizi İle Biyoaktif Bileşenler Tayini .....	42
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>48</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>52</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>61</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 1.1** Bakulovirüs Oklüzyon Cisimciklerinin (OB), Gömülü Viryon (ODV) Ve Tomurcuklanmış Viryonun (BV) Yapısının Şematik Diyagramları.....4
- Şekil 1.2** Bakulovirüslerin Yaşam Döngüsü.....5
- Şekil 1.3** Avrupa Hornet (*Vespa crabro*) Yuvası.....12
- Şekil 3.1** Çalışmada Kullanılan Arı (*Vespa crabro*) Yuvası.....18
- Şekil 4.1** Arı Yuvasının 60 Saatlik Maruziyet Sonrasında Sf9 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....26
- Şekil 4.2** Arı Yuvasının 60 Saatlik Maruziyet Sonrasında Sf9 Hücre Hattına Karşı Sitotoksitesisi Üzerindeki Etkisi..... 28
- Şekil 4.3** Enfekte Olmamış *Spodoptera frugiperda* (Sf) Hücreleri. Büyütme 20 µmx. Kontrol 1. Hücre A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat..... 29
- Şekil 4.4** AcMNPV İle Enfekte Edilmiş *S. frugiperda* Hücreleri. Kontrol 2. Virüs +Hücre A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat D: 72saat. Büyütme 20 µmx. Polihedral İnküzyon Yapıları (PIB) Göstermektedir..... 29
- Şekil 4.5** Arı Yuvası Numunesi Etanol Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon A1: 25 µg/ml, Sitopatik Etki Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir.....31
- Şekil 4.6** Arı Yuvası Numunesi Etanol Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon A2: 50 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir..... 32
- Şekil 4.7** Arı Yuvası Numunesi Aseton Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon B1: 25 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir..... 33
- Şekil 4.8** Arı Yuvası Numunesi Aseton Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon B2: 50 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir..... 34
- Şekil 4.9** Arı Yuvası Numunesi Petrol Eteri Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon C1: 25 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir..... 35
- Şekil 4.10** Arı Yuvası Numunesi Petrol Eteri Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon C2: 50 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir..... 36
- Şekil 4.11** Arı Yuvası Ekstraktlarının Farklı Konsantrasyonlarının Virüs Üretimi Üzerine Etkileri..... 37

- Şekil 4.12**Farklı Çözücülerde Ekstrakte Edilmiş Eşek Arısı Yuvası Numunelerinin *Spodoptera frugiperda* (Sf) Hücrelerinde AcMNPV'nin Ürettiği Protein Bantlarının Belirlenmesi. A1: 25 mg/ml, A2: 50 mg/ml B1: 25 mg/ml, B2: 50 mg/ml, C1: 25 mg/ml C2: 50 mg/ml Hk Hücre Kontrolü Vk Virüs Kontrolü, Mr: Marker *Autographa californica* İle Enfekte Olmuş *Spodoptera frugiperda* Hücresi %12 SDS Poliakrilamid Jelde Nükleer Polihedroz Virüsü (NPV) Olarak Gösterilmektedir. .... 39
- Şekil 4.13**Farklı Konsantrasyonlarda Arı Yuvası Ekstraktları İle İnkübe Edilen pUC18 Plazmid DNA'nın Jel Elektroforez Görüntüleri, 1: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA. 2: TE Kontrol pUC18 Plazmid DNA. 3: DMSO Kontrol pUC18 Plazmid DNA. 4: pUC18 Plazmid DNA. 5: 6.25 mg/ml Arı Yuvası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA. 6: 12,5 mg/ml Arı Yuvası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA. 7: 25 mg/ml Arı Yuvası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA. 8: 50 mg/ml Arı Yuvası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA.....41

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Çizelge 4.1</b> Arı Yuvası Konsantrasyonlarının 60 Saatlik Maruziyeti Sonucu Elde Edilen Verilerden Hesaplanan Hücre Canlılığı Değerleri .....	26
<b>Çizelge 4.2</b> Arı Yuvası Konsantrasyonlarının 60 Saatlik Maruziyeti Sonucu Elde Edilen Verilerden Hesaplanan Sitotoksisite Değerleri. ....	27
<b>Çizelge 4.3</b> Farklı Konsantrasyonlarda Arı Yuvası Ekstraktlarının Virüs Üretimi Üzerine Etkileri.....	37
<b>Çizelge 4.4</b> <i>Autographa californica</i> İle Enfekte Olmuş <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf) Hücresinin Ekstraktlarında Polihedrin Bantlarının Varlığı %12 SDS Poliakrilamid Jelde Nükleer Polihedroz Virüsü (NPV).....	40
<b>Çizelge 4.5</b> GC-MS Analizi Yapılan <i>V. Crabro</i> Yuva Ekstraktlarının Biyokimyasal İçerikleri (>%0.1 Olan). ....	42
<b>Çizelge 4.6</b> GC-MS Analizi Yapılan <i>V. Crabro</i> Yuva Ekstraktlarının Biyokimyasal İçerikleri (>%1 Olan) .....	46

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

---

<b>AcMNPV</b>	: <i>Autographa californica</i> Multikapsid Nükleer Polihedrozis Virüsü
<b>BEVS</b>	: Bakulovirüs Ekspresyon Vektör Sistemi
<b>BSA</b>	: Bovin Serum Albumin
<b>BV</b>	: Ekstraselüler Virüs
<b>CPE</b>	: Sitopatik Etki
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>GV</b>	: Granülosis Virüsü
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Yüzde Elli İnhibitor Konsantrasyon Değeri
<b>IU/ml</b>	: Mililitrede Enfeksiyon Yapabilen Virüs Sayısı
<b>MOI</b>	: Hücre Başına Enfeksiyon Yapabilen Virüs Sayısı
<b>MTT</b>	: Metiltiazol Difenil Tetrazolyum
<b>NMR(X-IŞINI)</b>	: Nükleer Manyetik Rezonans
<b>NPV</b>	: Nükleer Polihedrozis Virüsü
<b>ODV</b>	: Gömülü Virüsler
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Salin
<b>PIB</b>	: Poliheral İnklüzyon Yapı
<b>PM</b>	: Hipertrofik Membran
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>Sf</b>	: <i>Spodoptera frugiperda</i>
<b>TCID<sub>50</sub></b>	: Yüzde Elli Enfektif Doz
<b>TN-MFH</b>	: Ttichopulasia Ni Medium By Fred Hink

---

## **1. GİRİŞ**

### **1.1 Böcek Virüsleri**

Böcekler, yeryüzünde çok fazla çeşitliliğe sahip hayvan türleri olup, canlılar içerisinde belki de çok sayıda bulunan hayvan sınıfıdır. Dünyada tanımlanan hayvan çeşitlerinin 4/5'ini böcekler meydana getirmektedir (Anonim, 2008). Çeşitli mikrobiyal faktörler böceklerde doğal enfeksiyonlar oluşturmaktadır (Tanada ve Kaya, 1993; Boucias ve Pendland, 1998; Charles ve ark., 2000). Böcek virüsleri onların hastalanmalarına ve ölmelerine neden olan doğal faktörlerin başında yer almaktadır (Hunter-Fujita ve ark., 1998; Miller ve Ball, 1998). Böcek virüslerini doğaya ve insanlara yaptıkları etkilere göre iki şekilde değerlendirmek gerekir. Bunların ilki, insanlara ve çevreye faydalı olan ipek böceği ve bal arıları gibi böceklerin hastalanıp ölmelerine neden olmalarıdır. İkincisi de çeşitli tarım ve orman ürünlerini veya insan sağlığını etkileyen fındık kurdu, ladin kabuk böceği, amerikan beyaz kelebeği, sivrisinek gibi zararlı böcekleri enfekte etmeleridir. Şimdiye kadar çok sayıda böcek virüsü izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Sadece 800'den fazla bakülovirüs Arthropod'lardan izole edilmiştir (Murphy ve ark., 1995). Temel biyolojik olayların anlaşılmasına yardımcı olan bu virüsler araştırmaların yapıldığı önemli deney materyalleridir (Bilimoria, 1991; Demir, 2004). Böcek virüsleri önemli biyolojik mücadele ajanları olarak tarım ve ormancılıkta zararlı böceklerle karşı mücadelede kullanılmaktadır (Flexner ve Belnavis, 2000; Harrison ve Bonning, 2000; Sezen ve Demirbağ, 2005). Uzun yıllardan beri tıbbi, endüstriyel ve ekonomik bakımdan önemli çeşitli proteinlerin üretildiği gen ekspresyon vektörleri olarak biyoteknolojide kullanılmaktadır (King ve Possee, 1992; Demirbağ ve ark., 1998; Demir ve ark., 2000; Beljelarskaya, 2002). Ayrıca son zamanlarda bu virüslerin memeli hücre sistemlerine gen transferinde gen terapi vektörleri olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar da yoğunlaşmıştır (Ghosh ve ark., 2002; Hu, 2006).

### **1.2 Bakulovirüsler**

#### **1.2.1 Bakulovirüslerin Genel Özellikleri**

Bakulovirüsler, böcekler için öldürücü ve salgın hastalıklara neden olan büyük bir böcek virüsü grubunu temsil eder (Federice, 1999). Bakulovirüsler çevrelerinde

yaygın olarak bulunan ve 600'den fazla konak böcek türünden izole edilen Arthropod'lara özgü virüslerin bir ailesidir. Bunlara Lepidoptera (Pulkanatlılar), Hymenoptera (Zarkanatlılar), Diptera (Çiftkanatlılar), Orthoptera (Düzkanatlılar), Coleoptera (Kıncanatlılar), Neuptera (Sinirkanatlılar), Thysanera ve Trichoptera da dahildir (Tinsley ve Kelly, 1985; Adams ve Bonami, 1991). Birçok bakulovirüs türü Lepidopteradan izole edilmiştir. Bakulovirüsler 25x250 nm büyüklükte ve 80 ila 180 kbp arasında değişen, kapalı, dairesel, çift iplikli DNA genomlarına sahip DNA virüsleridir. Genomlar, inbacillus formunda nükleokapsidler olarak paketlenir ve bu nükleokapsid formuna "bakulovirüs" adı verilir. Günümüzde 29'dan fazla bakulovirüs tipinden genomlar, 4000'den fazla gen içeren bir veri tabanı elde etmek üzere dizilenmiştir (Hiscock ve Upton, 2000). Bakulovirüsler doğal popülasyonların büyüklüğünün düzenlenmesinde önemli bir ekolojik rol oynar (Odindo, 1983; Evans, 1986).

### **1.2.2 Bakulovirüslerin Kökeni**

Fosil kayıtları bize, karasal organizmaların denizden geldiğini ve toprağa açılan en eski gruplardan biri, günümüz böceklerinin öncüleri olan arthropodlar olduğunu söyler. Böcekler son 400 milyon yılda evrilmiş ve değişmiştir (Labanderia ve Sepkoski, 1993). Günümüz böcek virüsleri, antik arthropod atalarının dünyaya getirdiği virüslere zarar verebilir. Bakuloviridae, formand fonksiyonunda karmaşıklığa sahip olan ve uzun bir evrim soya dayanan bir böcek virüsü ailesidir. Bakulovirüsler çevrede neredeyse her yerde bulunurlar. Karasal ve deniz ekosistemlerinde yaşayan eklembacaklılara bulaşır. Karada, yaşayan yüzlerce böcek türünde tanımlanmıştır (Martignoni ve Iwai, 1986). Uzun yıllar ormanlar, tarlalar, nehirler, evler, ev ambarları diğer refüj çatlakları gibi yerlerde veya bitkilerde yaşamak için özel olarak tasarlanmışlardır (Jacques, 1975). Yediğimiz yiyeceklerde ve soluduğumuz havada olağanüstü sayılar sunarlar. (Heimpel ve ark., 1973).

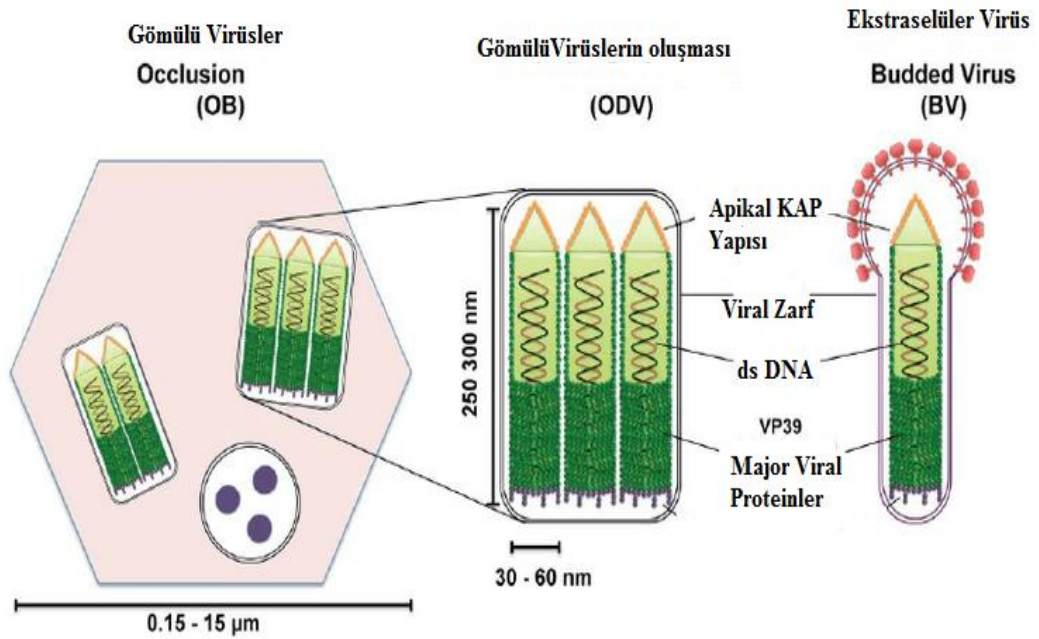
### **1.2.3 Bakulovirüslerin Genetiği ve Morfolojisi**

Bakulovirüsler genetik ve morfolojik olarak diğer virüs ailelerinden ayrıdır ve arthropodlar için alışılmadık derecede katı bir spesifikasyona sahiptir. Bakulovirüsün Lepidoptera (Zanotto ve ark., 1993) ile bir arada bulunduğu, çoğu bakulovirüsün bu

bölgeden ve lepidopteran bakulovirüs isolatlar arasında spesifik olan daha yüksek türlerden izole edildiği ileri sürülmüştür. Diptera ve Hymenoptera gibi diğer ordolardan izole edilen bakulovirüsler de Lepidopteran bakulovirüslerden daha az karmaşıktır (Afonso ve ark., 2001; Garcia-Maruniak ve ark., 2004; Herniou ve ark., 2003; Lauzon ve ark., 2004). Lepidoptera, Senozoik döneminin (65 milyon yıl önce) daha sonraki yarısında meydana gelen önemli bir ayrışmayı deneyimlemek için kullanılan son unsurlardan biridir (Labanderia ve Sepkoski, 1993).

Bugün bir virüs ailesi olarak hayatta kalmak için bakulovirüsler, zarflanmış viryonları koruyucu protein katmanları içine alacak şekilde gelişmiştir. Bakulovirüslerin oklüzyon bakulovirüs olarak adlandırılan protein kristallerindeki viryonları, tıkanma geçirgenliğinin evrimine bağlanabilir. Tıkanmış virüsler, omurgasızlar dışında herhangi bir türe bulaşmaz, bu da ortamda kalıcılığın böcek virüsleri için kritik olduğu anlamına gelir. Bakulovirüs Oklüzyonu (OB), virolojide ayırt edici bir yapıdır. Bakulovirüs OB'leri, virüse bağlı olarak 500 ile 2000 nm çapında bir ışık mikroskobu ile gözlemlenecek kadar büyüktür (Adams ve Bonami, 1991; Bilimoria, 1991; Boucias ve Pendland, 1998). Bu özellik en eski virüs parçacıkları olan bakulovirüsleri ortaya çıkarmıştır. OB'ler, bakulovirüslerin on yıllarca veya belki de yüzyıllarca çevrede hareketsiz ancak canlı bir halde kalmasını sağlayan bir uyarmadır (Bergold, 1963a). Bakulovirüs viryonları, virüsleri konakçı dışında kurumaya ve yaşayabilirlik kaybına duyarlı hale getiren iki tabakalı lipid zarflara sahiptir (Cox, 1989). Birçok zarflı virüsün hayatta kalma aracı, konakçılarda veya bir rezervuar konakçı türüne latentvirüs olarak bulaşmaktır. Örneğin, insan konaklarında (Efsthathiou ve Preston, 2005) ve SARS koronavirüste onlarca yıldır saklanan herpes virüsünün yarasalarda medeniyetlerce devam ettiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2005). Bakuloviridae familyasına bağlı bulunan ve oklüzyon bakulovirüslerin morfolojisine dayanan nükleopolihedrovirüsler (NPV) ve granülovirüsler (GV) olmak üzere, iki ana bölüm veya cins tanımlanmıştır. *Autographa californica* multikapsid nükleopolihedrovirüsü (AcMNPV) nükleopolihedrovirüs türüne ait olup ilk olarak yonca tırtılı böceğinden izole edilmiş ve en fazla çalışılan örnek bir bakulovirüs tipidir (Demirbağ, 1993). Tip türü olmasından dolayı ve bakulovirüslere ait özellikleri iletmesi nedeniyle, bakulovirüslerin biyolojileri ile ilgili olan bilgiler, AcMNPV üzerinden

verilmektedir. Nükleopolihedrovirüsler, bir zarf içerisine 1-18 nükleokapsidin gömülmesiyle meydana gelir. Bu zarfa sahip virüsler (viryonlar), tek bir proteinden oluşan polihedrin (28 kDa) denilen kristal benzeri cisimler içerisine gömülürler. Bunlara polihedral inklüzyon yapılar (PIB) denilmektedir. PIB yapıları içerisine gömülen virüslere de gömülü virüsler (ODV) adı verilir (Şekil 1.1). Virüse ait protein miktarının %90'ı polihedrin proteini olmasına rağmen, bu protein virüsün hücrelerde replikasyonu için gerekli değildir. O sadece virüs partiküllerinin tabiat şartlarında korunmasını sağlayan matriks oluşumunda rol alır. Bileşik ışık mikroskobu altında görülebilen protein OB'lerinde, OB morfolojileri bu iki bakulovirüs grubunun viryonları tarafından bloke edilir. NPV'lerin OB'leri boyutları büyük ve hafif refrakter polimerik yapılarından dolayı daha kolay görülür. NPV'lerin ortalama çapı 800-2000 nm arasındadır (Bilimoria, 1991).

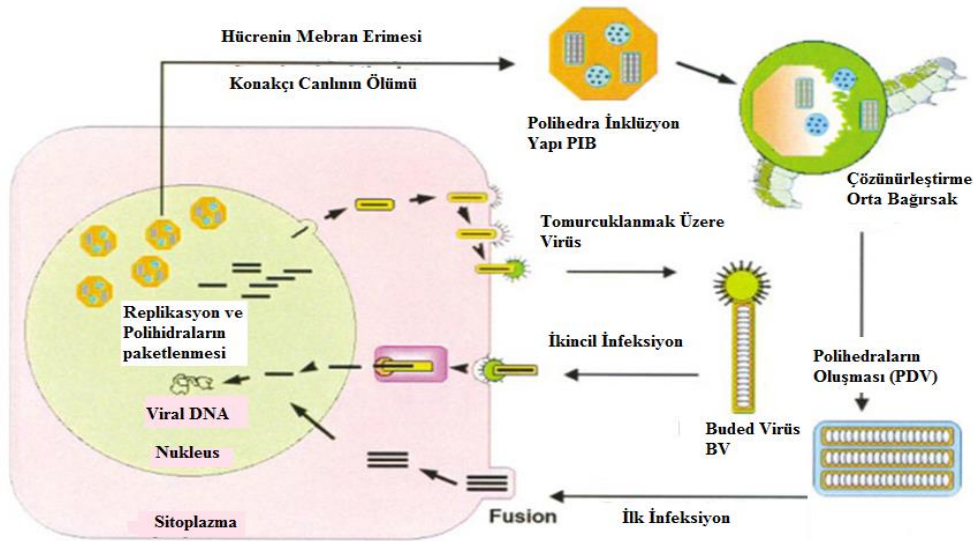


**Şekil 1.1** Bakulovirüs Oklüzyon Cisimciklerinin (OB), Gömülü Viryon (ODV) Ve Tomurcuklanmış Viryonun (BV) Yapısının Şematik Diyagramları (Bilimoria, 1991)

GV'lerin OB'leri koyu renkli granüller olarak görünür ve ışık mikroskobunda görünümü nispeten daha zordur. Bunlar oval şekilli ve yaklaşık 500 nm uzunluğunda ve 200 nm genişliğindedir (Boucias ve Pendland, 1998). NPV'lerin OB'lerine polihedra, GV'lerin OB'lerine granülin denir. Bu isimlendirmeyi takiben, polihedranın ana protein bileşeni polihedrin ve granülin ana protein bileşeni



granüllerdir. Polihedrinler ve granüller moleküler ağırlıkta 30 kDa'dır. Hem polihedrin hem de granüller, viryonları içeren kristal bir kafes oluştururlar. Düzinelerce viryon bir polihedranda bloke edilir, tek bir viryon bir granülde bloke edilir. Polihedrin ve granüllerin doğal durumu kristaller olmasına rağmen, bu proteinlerin hiçbirinin atomik yapısı belirlenememiştir. Bunun nedeni, polihedra ve granüllerin sadece böcek hücrelerinin çekirdeklerini oluşturmasıdır. Bu proteinlerin her ikisinin de bol miktarda alımı kolayca elde edilebilir, ancak bunlar NMR veya X-ışını kristalografisi için uygun formlarda başarıyla çözülemezler ve kristalleştirilemezler. X-ışını kırınımı OB'lerin kendileri üzerinde gerçekleştirilmiştir (Bergold, 1963b; Harrap, 1972). Bu veriler, elektron mikroskopu (EM) çalışmaları ile birlikte, polihedrin proteinlerinin nodüler küreler olarak altı noktada birbirleriyle temas ettiğini göstermektedir. Polihedrin kristal bütünlüğüne rağmen, ODV'ler rastgele OB'lere dönüşmüştür. Bunun yanısıra, ODV, lipid iki tabakalı zarf ile polihedrinmatriks arasındaki arayüz kompozisyonu bilinmeyen bir ağ içermektedir (Adams ve McClintock, 1991).



**Şekil 1.2** Bakulovirüslerin Yaşam Döngüsü

#### 1.2.4 Bakulovirüslerin Hücre Kültürlerindeki Replikasyonu

Bakulovirüslerin iletimi ve replikasyonu sadece böceklerin larva aşamalarında gerçekleşir. OB'ler böcek larvaları tarafından kontamine olmuş yiyecekler ile istenmeyen şekilde oral yoldan vücuda alınır. OB'ler gıda partikülleri ile midguta

(orta bağırsak) ön bağırsak yoluyla girer. Lepidopteralar alkali midgutlara (pH 10-11) sahiptirler (Terra ve Frereira, 1994). Bakulovirüslerde bu alkali midgut aşırı mikro ortamı tolere etmek ve kullanmak için gelişmiştir. Böceğin alkalitesi, OB'lerin çözünmesini ve tıkanmış viryonların midgut lümenine salınmasını sağlar. Bu nedenle, bu salınan virüs parçacıkları, ODV'ler olarak önceden tanımlanmıştır. Tıkanmış ODV'ler böcek orta bağırsağına bırakıldıktan 12 dakika sonra OB'lerden salınır (Adams ve McClintock, 1991) ve ODV'ler ortaya çıktığında hipertrofik membranı (PM) bozmaktadır. PM bir kitin ağı veya kafesidir ve orta bağırsak uzunluğu boyunca üretilen protein, orta bağırsak epitelyumunu koruyan içi boş bir tüp oluşturur. PM mukozanın böcek eşdeğeridir ve gıda parçacıklarının geçişini kolaylaştıran yapılardır. PM kafesi, çapları 21 ila 36 nm arasında değişen gözenek boyutlarına sahiptir (Barbehenn ve Martin, 1995). Sindirim enzimleri gibi küçük parçacıklar, peptitler, şekerler ve besin maddeleri kafesten serbestçe endoperitrofik lümenine geçebilir. PM, bakteri, mantar ve virüs gibi daha büyük parçacıkların geçişini kısıtlayarak bir bağışıklık savunması da sağlar. ODV'ler midgut dokularına erişmek için, PM'leri tesadüfen kazara lezyonlar yoluyla serbest bırakarak bozması gerekir (Greenspan ve ark., 1991; Hashimoto ve ark., 1991; Wang ve ark., 1994). İyotlar OB matriksinde ODV'lerle tıkanmıştır (Ohba ve Tanada, 1983; Wang ve ark., 1994). Orta bağırsak epitel enfeksiyonunda, ODV'ler esas olarak sindirim enzimleri içeren ve emici besin maddeleri içeren baskın kolon hücrelerine bulaşır, ektoperitrofik bölgeye giren ODV'ler, orta bağırsak epiteline yayılır. Lümen tarafında, kolon kenar hücre yüzeyleri mikrovillus ile kaplıdır. ODV'ler özellikle mikrovillusun apikal uçlarına bağlanır (Adams ve McClintock, 1991). ODV'lerin orta kültür hücre zarlarıyla doğrudan kaynaşmış lipit iki katmanlı zarfları vardır (Haas-Stapleton ve ark., 2004). Bunlar nükleokapsitlerin sitozole salınmasına neden olur. Bu nükleokapsitler, paketlenmedikleri çekirdeğe göç eder ve viral DNA genomu salınır yani serbest bırakılır. Virüs genleri eksprese edilir, yapısal genler sentezlenir, DNA replikasyonu meydana gelir, yeni virüsler toplanır ve salınır. Böcek orta bağırsağı, virüslerin enfekte olması için zayıf bir dokudur. Orta bağırsak hücreleri düzenli olarak dışarı atılır (Engelhard ve Volkman, 1995) ve hücre ölümüne eğilimlidir (Uwo ve ark., 2002). Bu hücreler bir enfeksiyon oluşturmak için bakulovirüslerin zamana karşı yarışı haline gelirler. Orta bağırsak sütunlu epitelyum ötesindeki dokular, virüs

replikasyonu için daha uygun olan hücreleri aktif olarak böler. Bununla birlikte, ODV, aşırı bir alkali ortamda orta bağırsak epitel hücrelerini enfekte etmek için dar bir şekilde uzmanlaşmıştır ve diğer hücre tiplerini enfekte ettiği gözlemlenmiştir. Böcek virüsleri, tesadüfen rastlanan enfeksiyonla karşılaştığında, hayatta kalma oranını en üst düzeye çıkarmak için maksimum döl ihtiyacı duyarlar. Belirli bir konakçıda daha fazla viral döl üretilebileceği için, bakulovirüslerin orta bağırsaktan ötesi enfeksiyon için önemli bir avantajdır. Bu avantaj, bakulovirüsleri ikinci, radikal olarak farklı, tomurcuklanan bir virüs (BV) fenotipi geliştirmeye yöneltmiştir. BV'ler, trakeoblastlar, hemositler ve yağlar dahil olmak üzere konakçının birçok iç dokusunu enfekte etmek için yaygın olarak uzmanlaşmıştır. BV girişi reseptör aracılı emici endositoz (Volkman ve Goldsmith, 1985) ve BV zarflarının asitliğine bağlı füzyonlarının endozomal membranlarla birleşmesiyle meydana gelir (Blissard ve Wenz, 1992; Leikina ve ark., 1992).

### **1.2.5 Bakulovirüsün DNA Virüs Modeli ve Çalışma Kolaylığı**

Araştırmacılar, dünyada hızla artan hastalıklara karşı kullanılacak olan ilaçların elde edilmesi ve geliştirilmesinde, besin maddesi olarak ihtiyaç duyulan bazı proteinlerin meydana getirilmesinde ve çeşitli genlerin moleküler düzeyde tanımlanmalarında, günümüzde oldukça geçerli olan ve etkili sonuçların elde edildiği biyoteknolojik çalışmalara başvurumaktadırlar. Bu alanda yapılan çalışmalarda, özellikle bakulovirüs ekspresyon vektör sistemi (BEVS) kullanılmaktadır. BEVS aracılığıyla tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli olan çeşitli prokaryotik, ökaryotik ve viral genlerin ekspres edilmeleriyle yeryüzünde oluşan ve insanlığı olumsuz yönde etkileyen birçok hastalığa karşı tedavi amaçlı kullanılan proteinlerin üretilmesi, besin ve ilaç hammadde eksikliğinin giderilmesi ve çeşitli organizmalara ait genlerin tanımlanması gibi önemli aşamalar kaydedilmiştir (Jasny, 1987; Vlak ve Keus, 1990).

Bakulovirüsler gen tedavi metodları kullanılarak çeşitli hastalıkların tedavisinde gen transfer vektörü olarak ele alınmaktadırlar (Volkman, 1995). Ayrıca bu virüsler, böcek kaynaklı olduklarından dolayı insan bağışıklık sistemine cevap vermemek ve insanlarda patojen olmamak gibi özellikleriyle diğer virüs vektörlerine göre gen tedavisinde kullanılmaları açısından önemli avantajlara sahiptirler (Kost ve Condreay, 2002; Van Oers, 2006). Bakulovirüslerin genomları ökaryotik ve

prokaryotik organizmalardan küçük olmasına rağmen, gen yapı ve düzeyleri bakımından bu organizmaların ve memelilerde enfeksiyon yapan virüslerin genomlarına kısmen benzerlik gösterdiklerinden dolayı moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmaları için iyi bir model teşkil etmektedir (Bilimoria, 1991).

Bakulovirüsler, daha öncede bahsedildiği üzere geniş bir virüs grubudur ve özellikle böceklerde bulunur (Theilman ve ark., 2005). Bakulovirüs konakları sadece omurgasızlarla sınırlı olduğu için ekolojik zararlılara karşı mücadelede, tarım ve orman zararlılarının kontrolünde biyolojik mücadele materyali olarak kullanılma potansiyellerine sahip olan faydalı ajanlardır (Inceoglu ve ark., 2001; Lacey ve ark., 2001).

Bakulovirüsler, insanlık tarafından elde edilen tüm virüsler arasında en yararlı antroposentriktir. Diğer virüsler çalışılırken sorunlara neden olurlar. Modern bakulovirolojinin temelinde, böcek zararlılarının kontrol edilmesi bakulovirüslerin potansiyel faydasına dayanmaktadır (Martignoni ve Iwai, 1986). Bakulovirüslerin gen ekspresyon vektörleri olarak mevcut kullanımı, bakulovirüslerin moleküler biyolojisinden gelmiştir. Bakulovirüs peptisitlerinin temel moleküler çalışmaları ile biyolojideki bakulovirüsleri ve genleri araştıran apoptotik yolların doğası işlevi ve güvenliği değerlendirilirken verimliliği artırılır (Ignoffo, 1981). Bu virüslerin ekolojik denge için, hangi zararlı türlerinin ve hangi kontrolün konakçı aralığını kontrol ettiğini bilmek daha da önemli olacaktır (Heimpel ve ark., 1973). Arthropod türlerinin çeşitliliğine dayanarak, bakulovirüs çeşidi "türleri" muhtemelen çok büyüktür. 500'den fazla farklı böcek türünde bakulovirüs hastalıklarının güncel literatür açıklamaları bulunur. Bununla birlikte, katı bakulovirüslerin genetik çeşitliliğinin doğası ve kapsamı hakkında bilgi ortaya çıkmaktadır (Elick ve ark., 1996).

### **1.3 Antiviral İlaçlar ve Etkileri**

Antiviral ilaçlar, bakteriyel olanlar yerine viral enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan bir ilaç sınıfıdır. Antivirallerin çoğu spesifik viral enfeksiyonlar için kullanılırken, geniş spektrumlu bir antiviral çok çeşitli virüslere karşı etkilidir. (Rossignol, 2014). Çoğu antibiyotiğin aksine, antiviral ilaçlar hedef patojenleri yok etmez; bunun yerine gelişimlerini engeller. Antiviral ilaçlar bir antimikrobiyal

sınıfıdır; ayrıca antibiyotik (antibakteriyel olarak da adlandırılır), antifungal ve antiparaziter ilaçlar veya monoklonal antikorlara dayanan antiviral ilaçlar içeren daha büyük bir gruptur (Kisung ve ark., 2003; Daniels ve ark., 2011). Çoğu antiviral, konakçıya nispeten zararsız kabul edilir ve bu nedenle enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılabilir. Bunlar, ilaç olmayan ancak vücudun içindeki veya dışındaki virüs parçacıklarını devre dışı bırakan veya yok eden virüslerden ayırt edilmelidir. Doğal antiviraller okaliptüs ve Avustralya çay ağaçları gibi bazı bitkiler tarafından üretilir (Schnitzler ve ark., 2001). Şu anda mevcut olan antiviral ilaçların çoğu HIV, herpes virüsleri, hepatit B ve C virüsleri ve influenza A ve B virüsleri ile başa çıkmak için tasarlanmıştır. Araştırmacılar, antivirallerin çeşitliliğini diğer patojen ailelerine yaymak için çalışmaktadırlar. Güvenli ve etkili antiviral ilaçların tasarımı zordur çünkü virüsler konakçı hücreleri çoğaltır. Bu, konakçı organizmanın hücrelerine zarar vermeden virüse müdahale edecek ilacın hedeflerini bulmayı zorlaştırır. Ayrıca, aşılardan ve anti-viral ilaçların geliştirilmesindeki ana zorluk, viral varyasyona bağlıdır.

Antivirallerin ortaya çıkışı, biyomedikal araştırmacıların virüslerin yapısını ve işlevini, yeni ilaç bulma tekniklerindeki önemli ilerlemeleri ve tıbbi üzerine uygulanan baskının anlaşılmasını sağlayan organizmaların genetik ve moleküler fonksiyonları hakkında çok geniş bir bilginin ürünüdür. İlk deneysel antiviraller 1960'larda çoğunlukla herpes virüsleriyle başa çıkmak için geliştirilmiş ve geleneksel deneme-yanılma ilaç keşif yöntemleri kullanılarak bulunduğu ortaya konulmuştur. Araştırmacılar hücre kültürleri üretmişler ve onları hedef virüsle enfekte etmişlerdir. Daha sonra viral aktiviteyi inhibe edebileceğini düşündükleri kültür kimyasallarını katmışlar ve kültürlerdeki virüs seviyesinin artmış olup olmadığını gözlemlemişlerdir. Benzer bir çalışma için etkili kimyasallar seçilmiştir. Bu çok zaman alıcı ve doğru bir prosedür olmakla birlikte hedef virüsün nasıl çalıştığı hakkında iyi bilgi bulunmadığında, çok az yan etkisi olan etkili antivirüslerin keşfedilmesinde etkili değildir. Sadece 1980'lerde, virüslerin tam genetik dizileri ortaya çıkmaya başladığında, araştırmacılar virüslerin nasıl çalıştığını ve üreme döngüsünü önlemek için tam olarak hangi kimyasallara ihtiyaç duyulduğunu öğrenmeye başlamışlardır. Virüsler, bir genom ve bazen bir proteinden (kapsid) oluşan bir kapsülde birkaç enzimden oluşur ve bazen bir lipit tabakasıyla (bazen 'zarf

olarak adlandırılır) kaplanır. Virüsler kendi başlarına çoğalamazlar ve kendi kopyalarını üretmeleri için bir konakçı hücreye boyun eğerek çoğalırlar, böylece bir sonraki nesli üretebilirler. Antiviraller geliştirmek için "akılcı ilaç tasarımı" stratejileri üzerinde çalışan araştırmacılar, yaşam döngülerinin her aşamasında virüslere saldırmaya çalışmışlardır. Bazı mantar türlerinin, benzer sinerjistik etkileri olan birden fazla antiviral kimyasal içerdiği bulunmuştur (Ulrike, 2005). Virüslerin genetik yapısı sürekli olarak değişmektedir ve bu nedenle virüs şu anda mevcut olan tedaviye dirençli olabilmektedir (Nijhuis ve ark., 2009). Virüsler, antiviral tedavi boyunca spontan veya aralıklı mekanizmalarla dirençli hale gelebilir (Influenza Antiviral Drug Resistance). DSÖ dirençli virüsün potansiyel bulaşmasını kontrol etmek ve gelecekteki ilerlemeyi önlemek için derinlemesine epidemiyolojik araştırmaları önermektedir (Hayden ve Jong, 2011). Antiviral direnç için yeni tedaviler ve tespit teknikleri geliştirildiğinden, antiviral direncin kaçınılmaz olarak ortaya çıkmasıyla mücadele etmek için stratejiler oluşturulabilir (Kimberlin ve Whitley, 1996).

#### **1.4 Aşılar ve Nüfus Sağlığı**

Çoğu antiviral ilaçlar viral enfeksiyonu tedavi ederken, aşılar patojenlere karşı ilk savunma hattıdır. Aşılama, bir bireyin bağışıklık sistemini uyarmak için az miktarda tipik olarak inaktive edilmiş veya zayıflatılmış antijenik materyalin enjekte edilmesini içerir. Bağışıklık sistemi, adaptif bağışıklığa neden olan spesifik olarak enjekte edilen patojene karşı savaşmak için beyaz kan hücrelerinin gelişimine cevap verir. Bir popülasyonda aşılama, sürü bağışıklığına, büyük ölçüde iyileştirilmiş popülasyon sağlığına, viral enfeksiyon ve hastalıkta önemli bir azalmaya neden olur (Heymann ve Aylward, 2006).

#### **1.5 Arılar**

Arılar, doğanın hiç şüphesiz ki en ilgi çeken canlılarını oluşturan sosyal böceklerdir. İnsanların kültürü ve ortak mitolojisiyle birlikte tarımsal alanlarda, ekonomide ve ekoloji içerisinde çok önemli bir yere sahip olmuştur (Engel ve Schultz, 1997). Dünyada insanlar tarafından doğrudan besin maddesi olarak tüketilen bitkilerin çoğu çiçek tozlarının yayılmasında arılara bağımlı olmuştur. Arı ile insan ilişkisi ekonomik olarak da insanların yararına olmuştur (Campbell, 1993). Arı deyince

aklımıza ilk olarak bal arıları gelmektedir. Temel olarak, arı sınıfı içerisinde bal arılarının yanı sıra farklı ve ilginç yaşamlarıyla yaban arıları da yer almaktadır (Kulike, 1986). Doğada bulunan birçok hayvan türünde olduğu gibi yaban arıları türünde de giderek azalma görülmektedir. Yaban arısı yuvalarının doğrudan imha edilmesi ve ilkbaharda uçan kraliçe arının öldürülmesi, doğal alanların ve ormanların hızla yok edilmesi, yaban arılarının besin kaynağını da oluşturan böceklerle bilinçsizce uygulanan insektisidler (böcek ilaçları) bu böcekleri av olarak kullanan arıların insektisidlerini direkt olarak vücutlarına almaları gibi nedenler yaban arılarının giderek azalmasında önemli etkenlerdir. Aynı zamanda çoğu insanın yaban arılarından korkup, arıları öldürme, yok etme gereği duyması da arıların giderek azalmasında önemli etken olduğu göz ardı edilemez (Kulike, 1986).

### **1.5.1 Vespidae (Yaban Arıları)**

Yaban arıları oldukça geniş bir familyadır. Bu familyanın 7 alt familyası vardır. Bunlardan Vespinae, Polistinae ve Polybiinae alt familyalarına bağlı türler sosyal, diğerleri bireysel (teksel) yaşayan böceklerdir (O'Brien, 1996). *Vespa* cinsi, çoğu Doğu Asya'da bulunmak üzere yaklaşık olarak 20 tür içerir. Batıda Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'yı içine alan, güney çöl kuşağına kadar uzanan Büyük Sahra, Arabistan, İran çölleri ve Çin'in de içinde bulunduğu Palearktik bölgede sadece, *V. crabro* L. ve *V. orientalis* fab. olmak üzere iki türü vardır. *Vespa* cinsinin en fazla tür ve en fazla çeşitliliğin olduğu güney Çin-Doğu Himalayalarının gelişim merkezi de olduğu kanıtlanmaktadır (Van Der Vecht, 1957). Her ne kadar *Vespa* taksonomisi bir dereceye kadar çalışılsa da çok sayıda alt tür ve bazı formların belirsiz statüsü daha fazla çalışmanın gerekli olduğunu göstermektedir (Van Der Vecht, 1957; Van Der Vecht, 1959; Yamane, 1974).

### **1.5.2 *Vespa crabro* (Avrupa Hornet)**

Avrupa hornet (*Vespa crabro*), Avrupa'ya özgü en büyük asosyal yaban arısıdır. Aynı zamanda 1800'lü yıllarda Avrupalı yerleşimciler tarafından tanıtılan Kuzey Amerika'da bulunan tek gerçek eşek arısıdır (*Vespa* cinsi) (Kosmeier, 2013). *V. crabro*, genellikle onunla temas eden insanlar tarafından bir zararlı olarak kabul edilir (Davis, 2011). *V. crabro* gibi Vespinae, çevredeki bitki materyalleri ve diğer liflerden kağıt benzeri yuvalar yapmakla bilinirler (Bagriaçık, 2011).

### 1.5.2.1 Avrupa Hornet Yuvası

Avrupa hornet yuvası, bireyleri tipik olarak bir pedikül (içeride bir kağıt tarak), bir zarf ve dışarıda tek bir giriş deliğinden oluşan kağıt yuvalarında yaşarlar. Yuvalar, kolonideki işçi arılar tarafından ağaç kabukları, dallar ve diğer mevcut bitki kaynakları gibi malzemelerin parçalanması, uzun süre çiğnenmesi ve arının tükürük salgısı ile karıştırmak suretiyle meydana getirilen kağıt hamuru karışımından oluşur. Arılar bu kağıt hamuru karışımından duvar deliği, ağaç kovuğu pek nadir hallerde toprak altı oyuklarda dört beş katlı, araları sütunlu ve askıda duran peteklerden oluşan yuvalar kurarlar. Peteklerin iç kısımlarında bulunan tarak duvarları, şekil bakımından düzenli değildir ve birbirine çok yakın yapıştırılmışlardır (Bagriaçık, 2011). Peteklerin üzerinde kemirilmiş selülozlu maddelerden yapılmış kağıt benzeri tabakalar bulunur. Kalın yapıda, sarımsı kahverengi renkte, çürümüş ağaç liflerinden yapılmış kağıt benzeri bu tabakaların yuvayı olumsuz dış etkilerden koruduğu bilinmektedir. Genelde yuvayı korumalı bir açıklıkta yapmayı tercih ederler (Bunn, 1988; Bambara ve Waldvogel, 1996; Hunt ve Arduser, 1996).



Şekil 1.3 Avrupa Hornet (*Vespa crabro*) Yuvası

Toprakta bulunan titanyum, demir ve zirkonyum gibi mineraller avrupa hornet yuvalarının tarak duvarlarının bir parçası haline gelir. Yuvanın ortalama kuru ağırlığı yaklaşık 80.87 g'dır. Kağıt taraktaki hücreler tipik olarak 4-5 mm uzunluğunda ve 8-9 mm çapındadır. Kuzey Türkiye'deki yuvaların ana bileşimi, ana elementler olarak oksijen, karbon ve nitrojeni içerirken, eser miktarlarda bulunan elementler ise silisyum, kalsiyum, demir ve potasyumdur. Alüminyum, magnezyum veya sodyumun ise bulunmadığı tespit edilmiştir. Avrupa hornet arıları, çevredeki toprağı,



yuvalarını inşa etmek için bir kaynak olarak kullanır. Lifli malzemenin gerçek tükürüğe oranı, yuvanın suyu emme kabiliyetini etkiler, böylece yuva içine kadar kuru kalır. Türkiye'de yapılan yuvalarda lif içeriği %23 iken, % 77'si hornet tükürüğüdür. Bu kombinasyon optimal su emme kapasitesini ile doğru orantılıdır (Bagriaçık, 2011).

### 1.5.3 Ülkemizde Vespidae

Türkiye'nin Vespidae faunasının oldukça zengin olduğu ve bu zenginliğin diğer ülkeler ile kıyaslandığında özellikle Akdeniz Bölgesinde çok yüksek bir biyoçeşitliliğe sahip olduğu belirtilmektedir (Yıldırım ve Özbek, 1992, 1993; Yıldırım, 2012; Yıldırım ve Gusenleitner, 2012). Aynı araştırmacılar, ülkemizde Vespinae ve Polistinae altfamilyalarına ait 5 cinse bağlı 22 türün bulunduğunu kaydetmişlerdir. Bunlardan, *Vespa crabro* L., *V. orientalis* L., *Vespula vulgaris* L., *V. germanica* (F.), *V. rufa* L., *Dolichovespula sylvestris* (Scopoli), *Polistes associus* Kohl, *P. gallicus* L., *P. biglumis* L., *P. dominula* (Christ) ve *P. nimpha* (Christ) türleri ülkemizin değişik yörelerinde yoğun popülasyon oluşturarak değişik şekillerde zararlı olmaktadır. Özellikle sonbaharda bu türler arı kovanlarına girerek balı yağma etmekte, çoğu kez kovanların sönmesine sebep olmaktadır. Ülkemizdeki bu türler bu yönüyle çok büyük önem taşımaktadırlar.

Doğada en sık rastlanan arı türlerinden olan yaban arılarından, işçi arıların boyu ortalama 22 mm, erkek arıların 24 mm ve ana arının 30 mm'dir. Baş ve göğüs bölgesi kızıl kahve renkli, ağız parçaları ise koyu sarıdır. Abdomenin ilk iki segmenti koyu kahve renkte, son 4 segmenti kirli sarı renktedir ve sarı zemin üzerinde simetrik şekilde kızıl kahve renkli benekler vardır. Abdomen, parlak ve kaygan görünüşlüdür. Eşek arılarının erginleri, sarıca arılara benzer ancak vücutları daha büyüktür (Kulike, 1986; Von Hagen, 1987; Özbek, 1988). Halk arasında Vespidae türlerine “eşek arıları”, özellikle bunların bal arılarının kovanlarına saldıranlarına da “harami arıları” veya “haramiler” denmektedir. Yine birçok yörelerimizde bilhassa *Polistes* cinsine ait türlere “sarıca arı, sarıcalı veya kızıl arı” isimleri verilmektedir. Özellikle Doğu Anadolu'nun değişik yörelerinde ise “bızık” veya “vızık” adı verilmektedir. Ancak halkımız bu gruptaki veya benzeri böcekleri yeterince tanımadığı için bal arısı dışındaki zar kanatlı böceklerin hemen hemen tamamını, özellikle de sarı veya

sarımsı kahverengi olanlarının tümünü “eşek arıları” olarak nitelendirmektedirler (Bunn, 1988; Bambara ve Waldvogel, 1996; Hunt ve Arduser, 1996).

### **1.6 Arı Yuvası Özütleri ve Hücre Kültürü Çalışmanın Önemi**

Nitekim son yıllarda yuvanın standart hale gelmesini kolaylaştırmak ve dünyanın farklı coğrafik bölgelerinden toplanan yuvaların tiplendirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (Bankova ve ark., 2000). Bizim yaptığımız çalışmada, eşek arısı yuvası ekstraktlarının içermiş olduğu etken madde veya maddelerden dolayı, bakulovirüs olan *Autographa californica* Multikapsid Nüklear Polihedrozis Virüsünün (AcMNPV), *Spodoptera frugiperda* (Sf) hücre kültüründe meydana getirebileceği replikasyonu herhangi bir aşamada etkileyebileceği düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan AcMNPV’ü böcek kaynaklı olduğundan insan bağışıklık sistemine cevap vermediği, insanlarda patojen olmadığı ve insanlarda enfeksiyon meydana getiren DNA virüslerine iyi bir model teşkil ettiği bilinmektedir (Kost ve Condreay, 2002; Van Oers, 2006). Bundan dolayı bu bakulovirüs üzerinde etkili olacağını düşündüğümüz eşek arı yuvasının ekstrakte edilerek antiviral özelliğinin belirlenmesinin ve insanda enfeksiyon oluşturan virüslere karşı kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca bakulovirüs ekspresyon sisteminde arı yuvası ekstraktlarının kullanılması ile bu ekstraktın sistemde oluşturduğu etkinin tıbbi ve ekonomik açıdan oldukça önemli olacağı düşünülmektedir. Eşek arısı yuvasının kimyasal yapısındaki değişkenlik onun tıp alanında kullanımında ve kalitesinin belirlenmesinde önemli bir sorundur. Yuvadan elde edilen kaynağın net olarak belirlenememesi kimyasal yapısını belirlemede de sorun oluşturmaktadır. Ayrıca yuvanın biyolojik aktivitesi belirlenirken yuvadan izole edilen aktif bileşenlerin belirlenmesi, söz konusu aktivitenin hangi bileşiklerden kaynaklanabileceği konusunda yorum kolaylığı sağlayacaktır (Burdock, 1998).

Çalışma da amaçlarımızdan en önemlisi eşek arılarının ağaç, çiçek ve kabuklardan topladığı ve kovanın her türlü korunmasından sorumlu, doğal bir ürün olan yuvaların, insan sağlığı açısından antiviral etkinliğinin bulunması durumunda bu maddelerin önemini belirlemek ve halk sağlığı adına, kimyasal ürünler yerine doğal ürünlere yönelme bilincinin artırılmasıdır. Bu sayede arı yuvası numunesinin antiviral özellikleri ile biyoaktif bileşenleri üzerine yapılan bu çalışma ile eşek arısı yuvası

üretimi ve kullanımının daha çok artacağı ve sağlığımızın korunmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Arı ürünleri üreticilerine bal, polen ve arı sütüne ek olarak, diğer bir arı ürünü olan yuvadan da kazanç sağlayabilecekleri bir madde olduğunu çalışmamız ile göstermek, üreticiler için yarar sağlayacağı da düşünülmektedir. Türkiye’de eşek arısı yuvası kullanım alanlarının artmasıyla üretimin daha da önem kazanması, bilinçli olarak yapılması ve bu alanda yeni teknolojilerin geliştirilmesiyle daha etkili ürünlerin elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışma ile şimdiye kadar çoğunun antiviral etkilerinin çalışılmadığı arı yuvası numunelerinin, biyoaktif bileşenleri ve bir böcek virüsüne karşı etkisi test edilmesi yararlı olabileceği gibi, farklı bölgelerden elde edilen ve botanik orijini farklı olan yuva örneklerinin kimyasal yapısının aydınlatılması gibi diğer yapılacak olan çalışmalar için de fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Eşek arı (*Vespa crabro*) yuvasından elde edilen özütlerin, *Autographa californica* multikapsid nükleer polihedrozis virüsünün (AcMNPV), *Spodoptera frugiperda* (Sf) hücre kültürleri içerisindeki replikasyonları üzerindeki etkileri ve antiviral özellikleri özellikleri ile ilgili literatür araştırmalarında daha önce yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Arı yuvasının içeriğinde bulunan biyoaktif bileşen analizinde üç farklı çözücüde (metanol, aseton, petrol eteri) ekstrakte edilmiş arı yuvası özütlerinden, metanol ekstraktında toplam %49.54 silikon bileşiği, aseton ekstraktında toplam %37.15 morfolin yapısı, petrol eteri ekstraktında %45.43 ester molekülü propenili içerdiği gözlenmiştir (Ertürk ve Bağdatlı, 2019).

Gaz kromatografi kütle spektrometre (GC-MS) sistemi ile arı yuvasından biyoaktif bileşenlerin analizlerinde Ertürk ve Bağdatlı (2019)'nın farklı çözücülerde ki arı yuvası ekstraktlarının biyokimyasal bileşen varlığı çalışmasında arı yuvası ekstraktlarının farklı kimyasal bileşenlere sahip olduğu gözlenmiştir. *V. crabro* metanol ekstraktında toplam %49.54 silikon bileşiği miktarı gözlenmiştir. Silikon bileşiklerinin farklı formlardaki bitkiler tarafından topraktan alınmalarının bir sonucu olarak ortaya çıktığı kaydedilmiştir (Brenda ve ark., 2016). *V. crabro* aseton ekstraktında toplam %37.15 morfolin yapısı olduğu gözlenmiştir. Morfolin içeriğinin toprakta bitki büyüme düzenleyicileri olarak bulunan ve bitkiler tarafından alınmaları sonucu yer aldığı kaydedilmiştir (Van de Westeringh ve Veldstra, 1958). *V. crabro* petrol eteri ekstraktında %45.43 ester molekülü propenili içerdiği kaydedilmiştir. Diğer önemli biyokimyasal bileşenler zirveleri alken, fenolikler, silanol, inositol, karboksilik asit olarak kaydedilmiştir. İnositol sahte bir vitamindir ve doğal olarak polihidroksi sikloheksan halkası olarak bitkilerde bulunan bir bitki metaboliti olan ve bitkilerin kökleri tarafından alınmasıyla ortaya çıktığı kaydedilmiştir (Witte, 2011).

### **3.MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Hücre Hattı ve Virüs Üretimi**

##### **3.1.1 Hücre Hattı**

Çalışmada *Spodoptera frugiperda* hücre soyu (Sf900) virüs enfeksiyonu için konakçı hücre olarak kullanılmıştır. Hücreler, %5 fetal sığır serumu (FBS), 100 birim/ml Gentamisin, 100ug/ml streptomisin ile 28°C'de T-25 m<sup>2</sup> kültür kapları ile takviye edilmiş ve Gibco Sf900 ortamında yetiştirilmiştir (Petcharawan ve ark., 2009; Petcharawan ve ark., 2012).

##### **2.1.2 Hücre Büyütülmesi ve Alt Kültür Yapılması**

Çalışma süresince kullanılan hücreler, her beş günde bir T-25 kültür kablarında %5 FBS ile takviye edilmiş TNM-FH insect media besiyeri içinde alt kültür edilmiştir. Hücreler, kültür kabı tabanında düzenli bir tabaka oluştururlar ve bu tabaka tek tabaka olarak bilinir (%90'lık tek tabaka olduğunda 5-6 günlük oluştururlar). Altkültür yapılacak kültür kabı içindeki besiyeri uzaklaştırılarak bunun yerine %5 FBS ile takviye edilmiş TNM-FH besiyerinden 5ml bırakılmıştır. Kültür kabının kapağı kapatıldıktan sonra, tabandaki hücrelerin besiyerine geçmesi için kültür kabı avuç içine alınarak diğer elin avuç içiyle sert fakat çok sarsmadan birkaç kez vurulmuş ve kap içi pipet ile yıkanmıştır. Sonrasında yeni bir kültür kabına, 4.5 ml FBS ile takviye edilmiş TNM-FH besiyeri konulmuş, diğer kapta bulunan hücre süspansiyonundan 0.5 ml alınarak yeni bir kap içerisine bırakılmıştır. Kültür kabı kapatılmış üzerine altkültür sayısı, tarihi ve hücrenin adı yazılmış ve 28°C'de inkübe edilmiştir. Bu işlemler tamamen biyogüvenlik kabin içerisinde yapılmıştır.

##### **3.1.3 Virüs Üretimi**

Virüs olarak bakulovirüs familyasına ait *Autographa californica* Multikapsid Nükleer Polihedrozis Virüs (AcMNPV) stoğu kullanılmıştır. AcMNPV stoğu Sf9'da inoküle edilerek hazırlanmış ve 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. AcMNPV üretimi için önce Sf9 hücreleri hemosimetre ile sayılmış, kültür kabına göre uygun sayıda hücre kap içerisine bırakılmış (25 cm<sup>2</sup> kap için 3.0×10<sup>6</sup> hücredir) ve son hacim 5 ml'ye tamamlanmıştır. Hücrelerin kültür kablarının tabanına yapışması için 2-3 saat kadar bekletilmiştir. Sonrasında kap içerisinde bulunan FBS takviye edilmiş TNM-

FH besiyeri uzaklaştırılmış, daha sonra 1 ml TNM-FH besiyeri bırakılmış ve MOI (hücre başına düşen enfeksiyon yapabilen virüs sayısı) 1 olacak şekilde virüs kültür kabına bırakılmıştır. Oda sıcaklığında 1-2 saat 2.5 rpm hızda santrifüj edilerek virüslerin hücrelere tutunması sağlanmıştır. Tutunmadan sonra kap içindeki TNM-FH besiyeri ve tutunamayan virüsler kabdan çıkarılmıştır. Daha sonra bu kaba gerekli 5 ml FBS takviye edilmiş TNM-FH besiyeri ilave edilmiş ve hücreler 28°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu zaman sonunda kültür kabındaki besiyeri-hücre karışımı steril bir santrifüj tüpüne aktarılarak 2500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek hücre ve diğer atıklar çöktürülerek üstte kalan virüs ihtiva eden sıvı (supernatant) steril bir şişeye nakledilmiştir. Stoğun virüs konsantrasyonu TCID<sub>50</sub> /ml olarak belirlenmiş ve pfu/ml'ye dönüştürülmüştür (Reed ve Muench, 1992). Virüs stoğu, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

### 3.2 Arısı Yuvası Materyali Temini ve Ekstraktların Hazırlanması

*V. crabro* (eşek arısı) (Hymenoptera: Vespidae) yuvasının antiviral özelliği ve kimyasal yapısı araştırılan bu çalışmada kullanılan arı yuvası numuneleri Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Trabzon ilinin Araklı ilçesinin, Yıldızlı köyünden 2018 yılında Temmuz-Ağustos ayları arasında eşek arılarının yuva yaptığı ahşap bir evin (39°43'E, 41°00'K) çatısından temin edilmiştir (Şekil 3.1). *V. crabro* yuvası, çatının ahşap yüzeyinden ayrılmıştır. Elde edilen yuva incelenmek için Ordu Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Yuvaların içerisinde bulunan arılar, larvalar ve pupalar çıkarılarak yuvalar küçük parçalara ayrılmıştır. Arı yuvası numuneleri Boeru (1978) ve Ertürk (2017) tarafından geliştirilen metotlar esas alınarak Şekil 3.1'de belirtilen şekilde yapılmıştır.



Şekil 3.1 Çalışmada Kullanılan Arı (*Vespa Crabro*) Yuvası

Eşek arısı yuvası örnekleri etanol, aseton ve petrol eteri olmak üzere üç farklı çözücü içinde 24 saat 35°C'de ekstrakte edilerek hazırlanmıştır. Yuva malzemesinden 5 gr alınarak son hacim 100 ml olacak şekilde çözücü ile tamamlanmıştır. Bu işlem her çözücü için ayrı ayrı yapılarak ekstraktlar hazırlanmıştır. Ekstraktlar pompa ile donatılmış bir döner buharlaştırıcı ile 35°C'de buharlaştırılmıştır. Hazırlama sırasında oda sıcaklığında korunmuş ve daha sonra filtrelenmiştir. Hazırlanmış olan ekstraktlar, kullanılıncaya kadar karanlık bir ortamda 5°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.3 Hücre Canlılığı ve Sitotoksite Analizi**

Arı yuvası ekstraktı, Sf9 hücre çizgisi kullanılarak MTT analizi ile in vitro sitotoksite için test edilmiştir (Mosmann, 1983). MTT yöntemi, mitogen, antijenik stimuli, büyüme faktörleri ve diğer büyüme tetikleyici faktörlere karşı hücre büyümesinin ölçülmesinde, sitotoksite çalışmalarında, hücre büyüme eğrisi çalışmalarında kullanılan oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Ancak bu yöntem, hücrelerin fizyolojik durumlarından ve mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesindeki değişimlerden etkilenmektedir. MTT testinde, sarı renkli tetrazolyum MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) metabolik olarak aktif hücrelerle dehidrojenaz enzim aktivitesiyle indirgenerek mor renkli formazan oluşturur. Bu redüksiyon sadece mitokondriyal redüktaz enzimleri aktif olduğunda gerçekleşmektedir. Dolayısıyla bu dönüşüm canlı hücre sayısı ile doğrudan ilişkilidir. Canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrojenazlar tetrazolyum halkasını parçalayarak mor renkli MTT formazan kristallerini oluşturur. Formazan kristalleri sulu çözeltilerde çözünmezler. Mor renkli bileşik absorbansı spektrofotometrede ölçülerek analiz edilmektedir (genelde 450-600 nm). Hücre sayısındaki artış MTT formazan oluşumunda artışa neden olmaktadır. Bunun sonucunda da absorbansda artış gözlenmektedir.

Çalışmada ham arı yuvası ekstraktı kullanılmıştır. Ham arı yuvası ekstraktı, 1ml dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözündürülmüş ve 5 mg/ml konsantrasyonlu bir stok çözeltisi elde etmek için 10 ml son hacim olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok çözeltisi filtrasyon ile sterilize edilmiş ve TNM-FH ortamında farklı konsantrasyonlarda (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 ve 0.781 µg/ml) seyreltilmiştir. Hücreler, 96 gözlü bir plaka içine her bir göz için  $2 \times 10^4$  oranında

ekilerek ve 24 saat boyunca 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra, kültür ortamı, ekstraktların farklı konsantrasyonlarını içeren taze ortam ile değiştirilmiştir. Her konsantrasyon 4 göze ve 3 bağımsız deneyde uygulanarak kontrol hücreleri, ekstraktlar olmadan inkübe edilmiştir. 28°C'de 60 saat inkübasyondan sonra, her bir oyuğa MTT (PBS içinde 5 mg/ml'lik 10µL) ilave edilmiş ve hücreler, 4 saat boyunca 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında, MTT içeren ortam kuyulardan çıkarılmış ve oluşan formazan kristali, 150 µL/oyuk %10 SDS: DMSO (1: 9) karışımı ilave edilerek çözündürülmüştür. Plakalar daha sonra 5 dakika boyunca çalkalanmış ve her bir oyuktaki çözeltinin absorbansı bir mikrotiter plaka okuyucuda 450 nm'de ölçülmüştür (Siddiqui ve ark., 2010). Elde edilen veriler ile normalizasyon işlemi yapıldıktan sonra denklem (1.1) ve (1.2) kullanılarak hücre canlılığı (%) ve sitotoksosite (%) değerleri belirlenmiştir. Kontrol kuyucuklarından elde edilen değerlerin ortalaması %100 canlı hücre olarak kabul edilmiştir. Her arı yuvası konsantrasyonu için 24 saatlik maruziyet sonrası IC<sub>50</sub> değerleri de belirlenmiştir. Sitotoksosite yüzdesi, A ve B'nin sırasıyla kontrol hücreleri ve muamele edilmiş hücrelerin absorbansı olmak üzere  $\{(A-B) / A\} \times 100$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm absorbans değerleri, sadece büyüme ortamını içeren boş kuyulara karşı düzenlenmiştir. Kontrollere göre %50 sitotoksositeye neden olan konsantrasyonun değerlendirilmesi için (IC<sub>50</sub> değerleri) GraphPad Prism yazılım programı kullanılarak deneyde hesaplanmıştır (Chiba ve ark., 1998; Krzyminska ve ark., 2010; Duman, 2012; Petcharawan ve ark., 2012).

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = (\text{Doz uygulanan kuyucuğun ortalama absorbans değeri} / \text{kontrol kuyucuğun ortalama absorbans değeri}) \times 100 \quad (1.1)$$

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = 100 - (\text{Doz uygulanan kuyucuğun ortalama absorbans değeri} / \text{kontrol kuyucuğun ortalama absorbans değeri}) \times 100 \quad (1.2)$$

### 3.4 İstatistiksel Analiz

Tüm veriler SPSS istatistik 17.0 yazılımı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Hipotez test yöntemleri, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Duncan'ın yeni çoklu aralık testleri, post hoc veya çoklu karşılaştırma testleri içermektedir. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olarak kabul edilmiştir (Custódio ve ark., 2011).



### 3.5 Arı Yuvasının Antiviral Aktivite Analizi ve Virüsün Sitopatik Etkilerinin Belirlenmesi

Virüsler, üretici konak hücreleri enfekte ettikten ve bu hücelere girip replike olduktan sonra hücrelerde çeşitli farklılıklar oluştururlar daha sonra tekrar dışarı çıkarlar. Bu replikasyon sırasında hücrelerde meydana gelen değişimler sitopatik değişimlerdir (CPE). Virüs (AcMNPV) etkinliğinde, faz contrast ya da karanlık saha mikroskop teknikleri yardımıyla AcMNPV ile enfekte olmuş hücrelerin (Sf) incelenmesi halinde gözlenen sitopatik etkiler; önce hücrelerde bir kararma ve zarlarında kırışıklıklar görülmeye başlar. Hücreler büyür, stoplazmik uzantılarını kaybederler ve çeşitli şekiller alırlar. Tabiatta larvadan larvaya enfeksiyon yapma özelliğine sahip olan polihedral inklüzyon yapıları (PIB) oluşturması ise hücrelerin içerisinde parlak kristal benzeri yapıların belirmesiyle anlaşılır (Bilimoria ve ark., 1992).

Bu çalışmada arı yuvası numunelerinin üç farklı çözücüde hazırlanmış ekstraktları kullanılmıştır. Arı yuvası ekstraktlarının antiviral etkisinin belirlenmesi, Burleson ve arkadaşlarının (1992) geliştirdiği metoda göre yapılmıştır. Çalışmada %5 FBS ile takviye edilmiş ve  $4 \times 10^4$  Sf9 hücreleri ile takviye edilmiş TNM-FH ortamı hazır durumdadır. Monolayer (tek tabaka hücre) oluşmuş bir kültür kabından deneyin yapılacağı 24 oyuklu kültür plakalarının her bir oyuğuna  $2.5 \times 10^4$  hücre ekilmiş ve üzerine gerekli miktarda (600 µl) FBS takviyeli TNM-FH besiyeri ilave edilmiştir. Sonrasında hücrelerin tabana yapışması için 4 saat kadar 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin tabana yapıştığından emin olunduktan sonra, bütün gözlerdeki besiyeri uzaklaştırılarak hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu ile yıkanmıştır (NaCl 0.8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g, 1 litre H<sub>2</sub>O, pH:7.2). Stok ekstraktlar TNM-FH besiyeri içerisinde, etanol, aseton ve petrol eteri ekstraktlarının her biri için 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 ve 0.781 µg/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde seyreltme yapılmış ve 24 kuyucuklu plakaların herbir oyuğuna eklenmiştir. Seyreltme işlemi 24 kuyucuklu plakaların 2. sütununun 1. gözünden başlayarak 4. gözüne kadar herbir seyreltikten 100µl bırakılmış ve birinci gözün ilk iki gözü Sf-AcMNPV kontrolü düzenlenmiştir. Uygulanacak diğer ekstraktlar da aynı şekilde seyreltilerek diğer gözlerle ekilmiş ve hepsi 1 saat boyunca 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon boyunca hücrelerin arı yuvası

ekstraktları ile temas etmesi sağlanmıştır. 24 gözlü plağın 1. gözüne katkısız TNM-FH besiyeri, diğer gözlere AcMNPV virüs süspansiyonundan 10 µl' lik MOI (her hücre için enfeksiyöz virüs partiküllerinin sayısı) enfekte edilmiş ve adsorpsiyon için oda sıcaklığında 1.5 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra virüs ve ekstrakt karışımı çıkarılarak hücreler PBS ile yıkanmış ve %5 FBS, 100 ug/ml içeren tam TNM-FH ortamı Gentamisin, 100 ug/ml streptomisin ortamı solüsyonu 24 gözlü plakalara ilave edilmiştir. Bu noktada, zaman, enfeksiyon sonrası "0" olarak kaydedilmiştir. Her kuyu kültürü plakası paneli, toksisite kontrolünü (hücreler+ekstrakt) ve enfekte olmayan hücre kontrolünü (sadece hücreler, Kontrol 1) ve enfekte olmuş hücre kontrolünü (virüs+hücreler, Kontrol 2) içermektedir (Ertürk ve ark., 2017, 24 kuyucuklu kültür plakaları). Plakalar 4 gün boyunca 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, hücreler kazınarak alınmış ve sayılmıştır. Bu esnada süpernatantın ayrılması için 20 dakika boyunca 4.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Temelleşmiş viryon içeren süpernatant kullanılıncaya kadar -20°C'de tutulmuştur. Her panelde toksisite kontrolü (ekstrakt ile inkübe edilmiş hücreler), enfekte olmamış hücre kontrolü (ortam ile inkübe edilmiş hücreler) ve enfekte olmuş hücre kontrolü (virüsle inkübe edilmiş hücreler) ve düzeltilmiş mortalite % kullanılarak hesaplanmıştır. Ekstraktların varlığında virüs tarafından üretilen pfu/ml'ye (ml başına plak oluşturma birimi) % indirgeme =  $100 - [(pfu \text{ at kontrolde verilen ekstrakt dozun/ pfu}) \times 100]$  olarak hesaplanmıştır (Sökmen, 2001).

Hücreler virüslerle temas ederek etkileşime girdikleri zaman hücrenin yapısında meydana gelen değişiklikler (Sitopatik etkiler, CPE) Leica İverted marka mikroskop ile incelenerek kayıt altına alınmıştır. Plate'in tüm gözlerinde meydana gelen değişiklikler görüntülenmiş, bu görüntülerin fotoğrafları mikroskobun M500 fotoğraf makinesi tarafından çekilmiş ve belgelenerek CD'ye aktarılmıştır.

### **3.6 Arı Yuvasının Virüs Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Arı yuvası numunelerinin etanol, aseton ve petrol eteri olmak üzere üç farklı ekstraktlarının her biri için ayrı ayrı işlem uygulanmış olup çalışmada virüs sayımı, TCID<sub>50</sub> metoduna göre yapılmıştır. Arı yuvası ekstraktlarının 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 ve 0.781 µg/ml konstrasyonunun uygulandığı besiyeri-virüs karışımından alınan sıvı, 1:10 oranında seyreltilmiştir. Üzerleri 1'den 10'a kadar

numaralandırılmış steril santrifüj tüplerinin her birine 180 µl TNM-FH besiyeri konulmuş içerisinde virüs miktarı bilinmeyen sıvıdan (süspansiyondan) sadece 2 nolu tüpe 20 µl bırakılmış, 1:10 oranındaki seyreltme işlemi, 9 numaralı tüpe kadar tekrarlanmış ve 9 numaralı tüpteki fazlalık olan 20 µl dışarı atılmıştır. 1 numaralı ve 10 numaralı tüpler kontrol olmak üzere hazırlanmıştır. Bu tüplere virüs yerine 20 µg/ml'şer TNM-FH besiyeri konulmuş sonrasında her tüpe ayrı ayrı  $2.5 \times 10^5$  hücre/ml'lik kültürden 200 µl hücre ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra 96 gözlü plate soldan sağa doğru 1'den 10'a kadar numaralı, yukarıdan aşağıya A'dan F'ye kadar harflendirilmiş her gözüne tüpten 10'ar µl konulmuştur. Hazırlanan seyreltiklerin her birinden yukarıdan aşağıya 6 göze (A, B, C, D, E, F) transfer edilmiştir. Bu işlem diğer numune ekstraktları için de uygulanmıştır. Plate'de 1. ve 10. sıralar sadece TNM-FH ile Sf hücreleri içerecek şekilde kontrol olarak düzenlenmiştir. Bu işlemden sonra plate kabının köşelerine ve orta kısımlarına 1'er damla olacak şekilde steril su konulmuş ve plate kapağı kapatılmıştır. Plate küçük bir poşet içerisinde ortamın nemli kalmasını sağlamak üzere ıslatılmış kağıt peçete ile sarılarak 28°C'de 3 ile 5 gün arasında inkübasyona bırakılmıştır. Mikroskop altında virüs sayımı yapılmıştır. Sayımda PIB'lerin olduğu gözler pozitif (+), oluşmadığı gözler ise (-) olarak adlandırılmıştır. Virüs miktarının hesaplanması iu/ml (mililitrede bulunan enfeksiyon oluşturabilir unite sayısı) olarak Reed ve Muench (1992) metoduna göre yapılmıştır.

### **3.7 Arı Yuvası Ekstraktlarının Virüsün Protein Sentezi Üzerine Olan Etkilerinin İncelenmesi, Protein Numunelerinin Hazırlanması ve SDS-PAGE**

Arı yuvası ekstraktlarının virüsün protein sentezine olan etkilerinin belirlenmesi için daha önce açıklanan "Arı yuvası ekstraktlarının virüs enfeksiyonuna uygulanması" metoduna göre yapılmış olan deneyin üzerinden 36 saat geçtikten sonra aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Üç farklı çözücüde hazırlanmış arı yuvası ekstraktlarının 1 ya da 2 saat süreyle ön-muamelesi ile Sf9 hücreleri, bir MOI' de enfekte olmuş ya da AcMNPV ile enfekte edilmiştir. Hücreler PBS ile yıkanmış olup, bir T-25cm<sup>2</sup> balonuna 5ml tam Gibco Sf9 ortamı ilave edilmiş ve kültür, 60°C' de 60 saat süreyle inkübe edilmiştir. Protein numuneleri hazırlanması, King ve Possee (1992) tarafından tarif edilen yöntemle göre

hazırlanmıştır. Kurulmuş deneyin başlangıcından 36 saat sonrasında kültür blanklarının her gözündeki besiyeri çıkartılmıştır. Buz üzerinde soğutulmuş PBS ile hücreler yıkanmıştır. Her göze 100 µg/ml ayrıştırma tamponu olan bir lizis tamponu (0.062 M. Tris-HCl pH:7, %2 SDS, %10 gliserin, %5 2-merkaptoetanol, 1 nM PMSF, 2 µg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Pepsitain, dH<sub>2</sub>O ile son hacmi 17 ml'ye ayarlanmış) konulmuştur. Bu tampon ile gözlerin tabanındaki hücreler koparılmıştır. Açığa çıkan virüs ve hücre içerikleri %12'lik SDS-PAGE ile analiz edilmiş (Laemmli, 1970) ve jeller gümüş nitrat ile boyanmıştır (Hames ve Rickwood, 1990).

### **3.8 Arı Yuvası Ekstraktının pUC18 Plazmid DNA'sı İle Etkileşimi Analizi**

Arı yuvası ekstraktlarının pUC18 plazmid (Thermo) DNA'sı hasarını koruma aktivitelerinin belirlenmesi için, ekstraktlar 5 farklı konsantrasyonlarda (0.03 µg/ml, 0.06 µg/ml, 0.125 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml) olacak şekilde hazırlanmıştır. Seri dilüsyon şeklinde hazırlanan arı yuvası ekstraktlarından 2 µl, 1.25 µg/ml'lik pUC18 plazmid DNA, %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve TE (Tris-EDTA) karışımı hazırlanmıştır. Bu işlemin ardından 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında %1'lik agaroz jelde 1XTBE (Tris-Borikasıit-EDTA) tamponuyla 90 dakika süre ile 100 Voltta jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiştir. DNA bantları etidyum bromür ile boyanarak V transillüminator cihazı ile (20 dakika) analiz edilmiştir.

### **3.9 Gaz Kromatografi Kütle Spektrometre (GC-MS) Sistemi İle Biyoaktif Bileşenlerin Analizi**

Arı yuvası ekstraktının biyoaktif bileşenlerinin analizi bir kolon ile (Teknokroma TRB 5-MS, 30 mm x 0.25 mm x 0.25 µm) ile donatılmış Shimadzu QP 2010 Plus Serisi Gaz Kromatografi Kütle Spektrometre sistemi kullanılarak katı faz mikroekstraksiyon tekniği (SPME)'ne göre yapılmıştır. GC-MS koşulları, fırın sıcaklığı ilk olarak 1 dakika boyunca -50°C de tutulmuş daha sonra 1 dakikada sıcaklık 250°C'ye çıkarılmıştır. Taşıyıcı gaz, 1 mL / dakika akış hızına sahip helyumdur. MS dedektör (Mass Spektrometre Detector) ve Restek-Rtx-5 kolonda 70°C // 250°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. (Colon Flow 2.12 mL/min.) Örnekler cihaza verilmeden önce 1/10 oranında asetonitril ile seyreltilmiştir. Örneğin değerlendirilmesi % alan dağılım oranına göre kalitatif olarak yapılmış ve

integrasyonlar genel olarak en büyük 30 pik üzerinden yapılmıştır. Bileşikler, Wiley kütüphanesinden W9N11 spektrumlarla karşılaştırılarak tanımlanmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

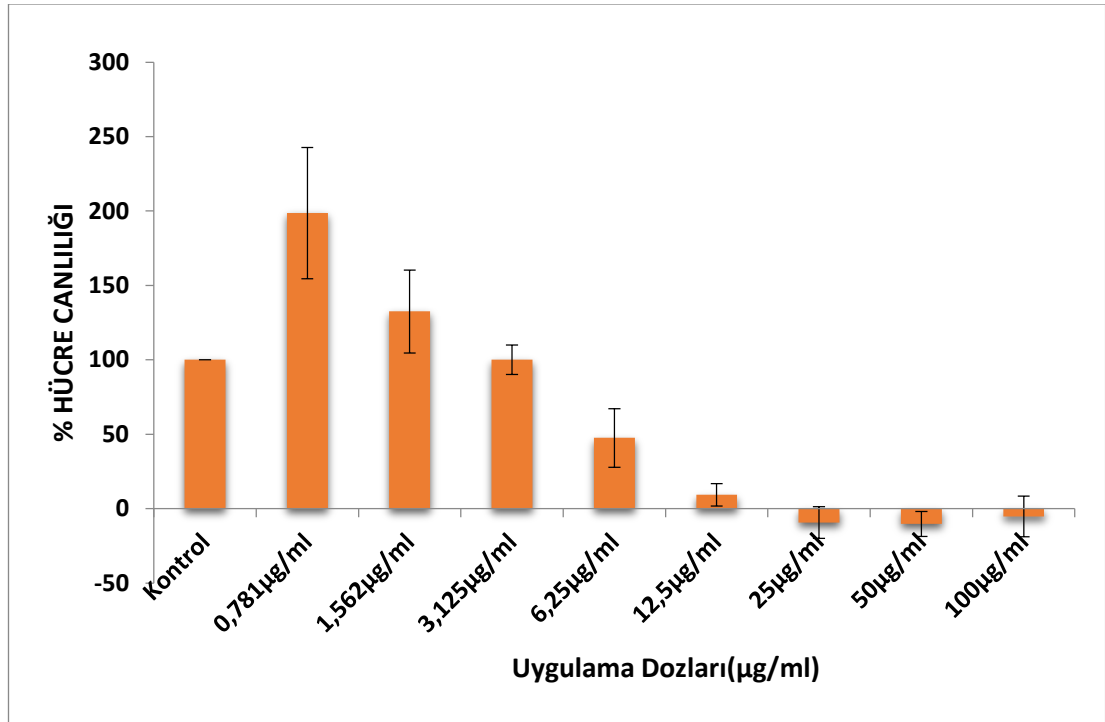
Bu çalışmada, eşek arısı yuvasından elde edilen kaba ekstraktların *Autographa californica* Multikapsid Nükleer Polihedrozis Virüsünün (AcMNPV) *Spodoptera frugiperda* hücre kültüründeki replikasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada arı yuvası ekstrakt veya ekstraktların uygulanmaları neticesinde; virüs sitopatik etkilerinde meydana gelen değişimler invert mikroskobu yöntemiyle, virüs konsantrasyonunda meydana gelen değişimler TCID<sub>50</sub> yöntemiyle, protein sentezinde meydana gelen değişimler sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle, pUC18 plazmid DNA'sı hasarını koruma aktivitelerinin belirlenmesi ise agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca yuvanın biyoaktif bileşen içeriği de gaz kromatografi kütle spektrofotometre (GC-MS) yöntemi ile araştırılmıştır.

##### 4.1 Hücre Canlılığı ve Sitotoksite Tayini

Ham etanol arı yuvası ekstraktlarının 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 ve 0.781 µg/ml konsantrasyonlarının Sf9 hücre hattına karşı etkisi MTT analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Arı yuvası ekstraktlarından hazırlanan, test edilen ilk üç konsantrasyon (0.781 µg/ml, 1.562 µg/ml, 3.125 µg/ml) hariç diğer konsantrasyonlarda (6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml) hücre canlılığındaki düşüşler kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). 60 saatlik maruz kalma sonrasında, hücre canlılığında görülen bu düşüşler konsantrasyona bağlı olmadığı belirlenmiştir. Test edilen ilk üç arı yuvası konsantrasyonunda (0.781 µg/ml, 1.562 µg/ml, 3.125 µg/ml) hücre canlılığı kontroldeki değerin üstünde çıktığı gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Uygulanan konsantrasyonların hücre canlılığını da doza bağlı olarak azalttığı görülmüştür (Şekil 4.1).

**Çizelge 4.1** Arı Yuvası Konsantrasyonlarının 60 Saatlik Maruziyeti Sonucu Elde Edilen Verilerden Hesaplanan Hücre Canlılığı Değerleri

Hücre+Farklı konsantrasyonlarda arı yuvası ekstraktı	% Hücre Canlılığı	Standart Hata
Kontrol+ AcMNPV	100	0
0,781µg/ml+Hücre + AcMNPV	198.61	44.16
1,562µg/ml+Hücre + AcMNPV	132.49	27.92
3,125µg/ml+Hücre + AcMNPV	100.11	9.97
6,25µg/ml+Hücre + AcMNPV	47.55*	19.72
12,5µg/ml+Hücre + AcMNPV	9.24*	7.55
25µg/ml+Hücre + AcMNPV	-9.30*	10.68
50µg/ml+Hücre + AcMNPV	-10.18*	8.38
100µg/ml+Hücre + AcMNPV	-5.25*	13.63



**Şekil 4.1** Arı Yuvasının 60 Saatlik Maruziyet Sonrasında Sf9 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

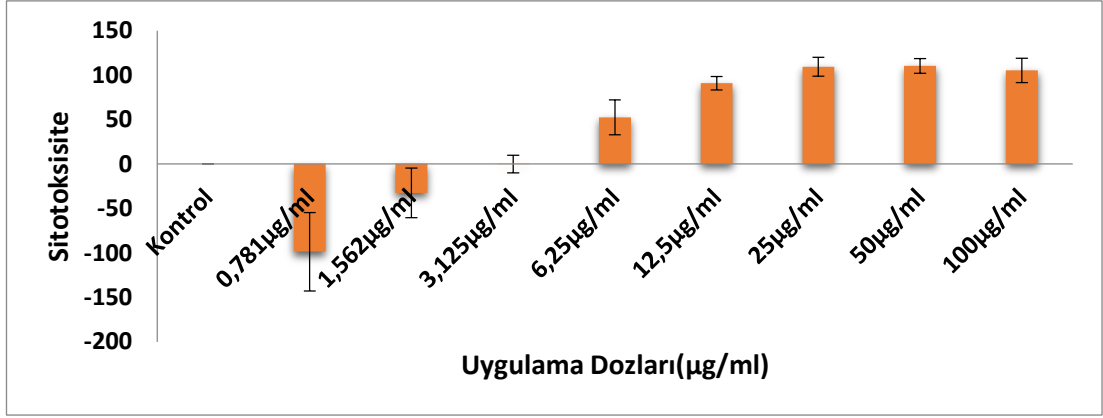
Arı yuvası ekstraktlarından hazırlanan 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 ve 0.781 µg/ml konsantrasyonlarından Sf9 hücre hattına karşı konsantrasyonunun sitotoksiste

değerlendirmesinin sonuçları Çizelge 4.2’de gösterilmektedir. Arı yuvası ekstraktının konsantrasyonlarının doz artışına bağlı olarak sitotoksisiteyi artırdığı görülmüştür (Şekil 4.2). 60 saatlik maruz kalma sonrasında, sitotoksisitede görülen bu artışlar konsantrasyona bağlı olmadığı belirlenmiştir. Test edilen ilk üç arı yuvası konsantrasyonunda (0.781 µg/ml, 1.562 µg/ml, 3.125 µg/ml) sitotoksisite kontroldeki değerinde olduğu gözlenmiştir. Özellikle arı yuvasının test edilen 6.25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml’ lik konsantrasyonlarının Sf9 hücreleri için oldukça toksik olduğu görülmüştür. 6.25 µg/ml ve üzeri konsantrasyonların sitotoksitesindeki artışlar kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2** Arı Yuvası Konsantrasyonlarının 60 Saatlik Maruziyeti Sonucu Elde Edilen Verilerden Hesaplanan Sitotoksisite Değerleri

Hücre+Farklı konsantrasyonlarda arı yuvası ekstraktı	Sitotoksisite	Standart Hata
Kontrol+ AcMNPV	0	0
0,781µg/ml+Hücre + AcMNPV	-98.61	44.16
1,562µg/ml+Hücre + AcMNPV	-32.49	27.92
3,125µg/ml+Hücre + AcMNPV	-0.11	9.97
6,25µg/ml+Hücre + AcMNPV	52.45*	19.72
12,5µg/ml+Hücre + AcMNPV	90.76*	7.55
25µg/ml+Hücre + AcMNPV	109.30*	10.68
50µg/ml+Hücre + AcMNPV	110.18*	8.38
100µg/ml+Hücre + AcMNPV	105.25*	13.64



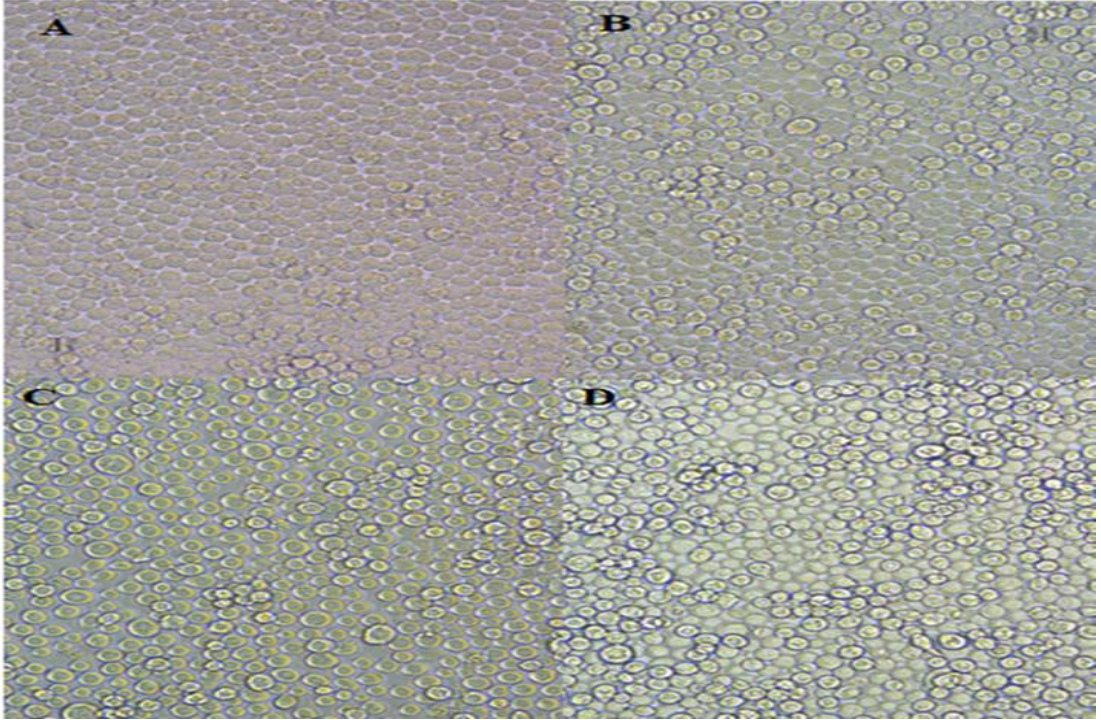


**Şekil 4.2** Arı Yuvasının 60 Saatlik Maruziyet Sonrasında Sf9 Hücre Hattına Karşı Sitotoksitesini Üzerindeki Etkisi

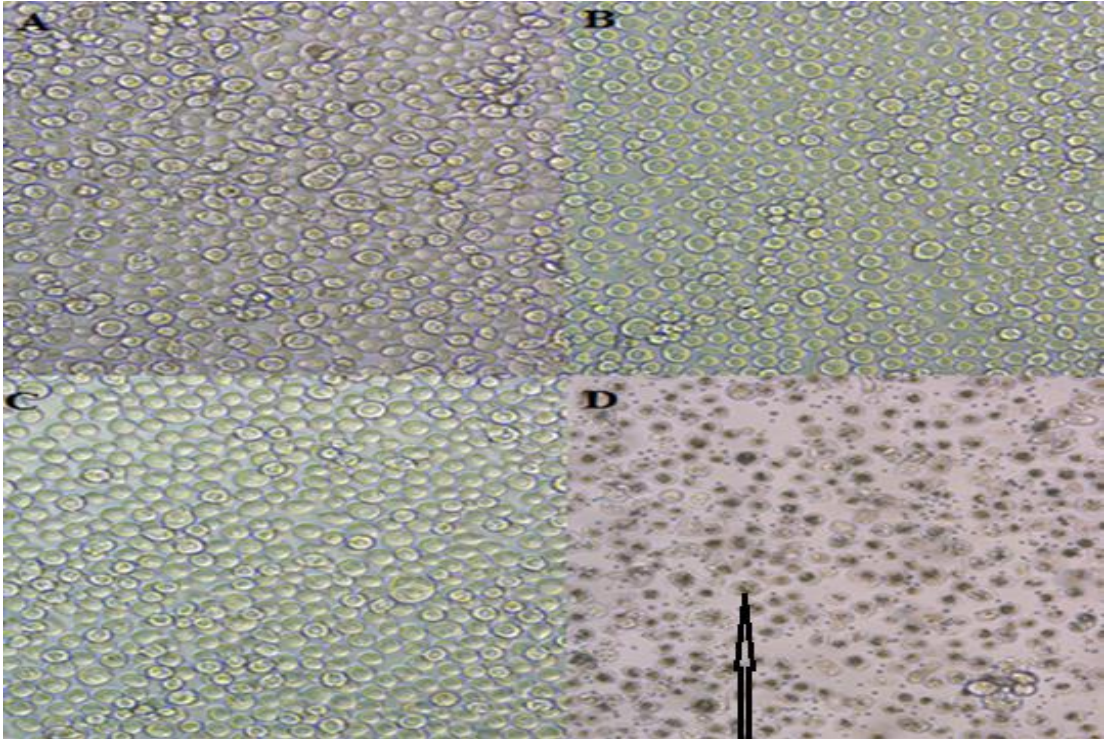
Arı yuvasının 60 saatlik maruziyeti sonucu belirlenen IC<sub>50</sub> değeri 6 µg/ml olarak belirlenmiştir. Gad tarafından bildirilen doğal bileşenlerin sitotoksitesinin sınıflandırılmasıyla kategorize edilebilir (Gad, 1999).

#### **4.2 Arı Yuvası Numunesinden Elde Edilen Üç Farklı Çözeltinin Sitopatik Değişimlere Olan Etkileri**

Çalışmada sitopatik değişimleri belirlemek amacıyla, kontrol 1 olarak enfekte olmamış Sf hücreleri, kontrol 2 olarak AcMNPV ile enfekte olmuş Sf hücreleri ve arı yuvasından elde edilen üç farklı ekstrakt için denenen ve belirlenen 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarının AcMNPV'nin hücre kültürlerindeki replikasyonu üzerine uygulanması sonucu meydana gelen sitopatik etkiler gözlenmiştir. Uygulanan 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 ve 0.781 µg/ml'lik konsantrasyonlarından en uygun miktar olan 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerde parçalanma olmadığı ve hücreler üzerinde çok olumsuz bir stres meydana gelmediği gözlenmiş, bundan dolayı en uygun konsantrasyon olarak belirlenmiştir. 25 ve 50µg/ml konsantrasyonlarda gerçekleşen enfeksiyonun sırayla A) 0.saat, B) 24.saat, C) 48.saat, D) 72.saat sonra inverted mikroskopla belirlenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Test edilen bu konsantrasyonlarda elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. Kontrol 1 (Şekil 4.3)'de enfekte olmamış hücrelerin morfolojik durumlarında herhangi bir bozukluğun olmadığını, hücrelerin büyüdüğü fiziksel ve kimyasal ortamın hücrelerin büyümesi için uygun olduğunu göstermektedir. Kontrol 2 (Şekil 4.4)'de Sf hücrelerinin AcMNPV ile enfeksiyonları neticesinde en belirgin sitopatik etkilerden olan polihedral inklüzyon (PIB) yapıların oluştuğunu göstermektedir.



**Şekil 4.3** Enfekte Olmamış *Spodoptera frugiperda* Hücreleri. Büyütme 20  $\mu$ m. Kontrol 1. Hücre A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat



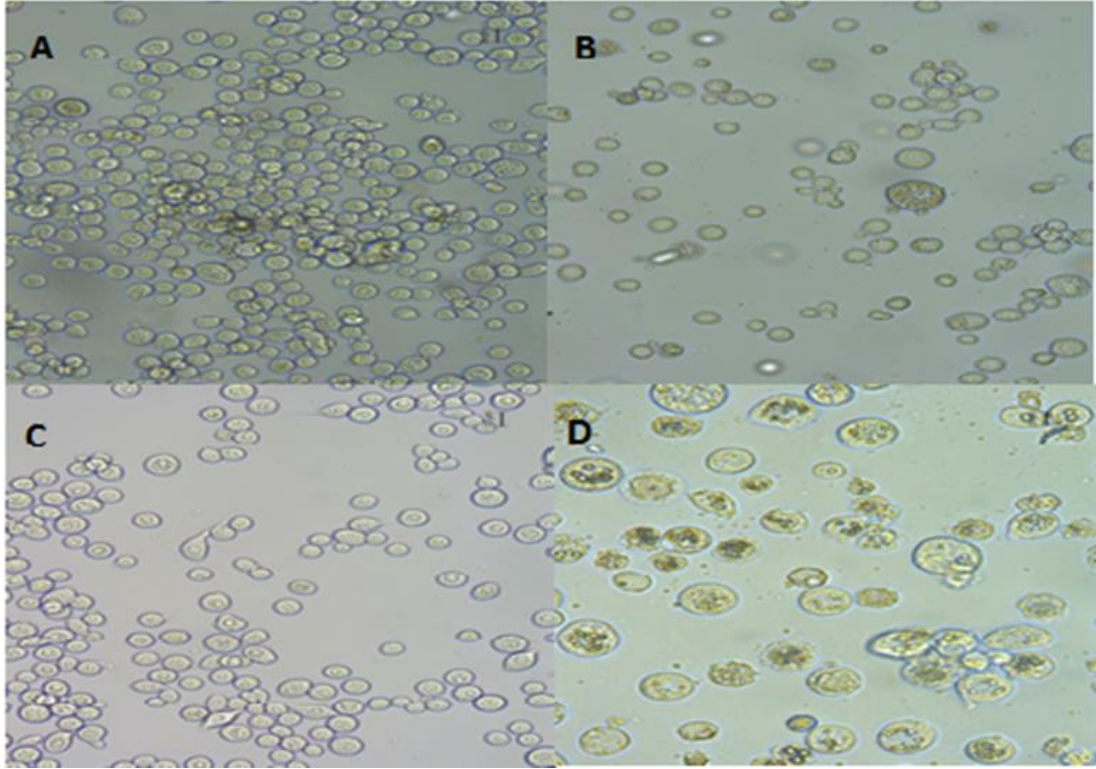
**Şekil 4.4** AcMNPV İle Enfekte Edilmiş Sf Hücreleri. Kontrol 2. Virüs+ Hücre A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat D: 72 Saat. Büyütme 20  $\mu$ m. Polihedral İnküzyon (PIB) Yapıları Göstermektedir

Bakulovirüsler genel olarak kontrolde (28°C’de) hücrelerle karşılaştıklarında ilk 1-2 saat içerisinde hücrelere tutunurlar. Hücrelere enfeksiyonundan 24 saat sonra konak hücrelerin iç kısımlarında koyulaşma başlarken, 48 saat sonunda ise hücrelerin içinde PIB’ler (Polihedral İnküzyon yapı) görünür. Bunlar parlak yapı şeklinde görülerekte belirlenebilirler. AcMNPV replikasyonu, hücrelerin çekirdeklerinde meydana geldiğinde, PIB’lerin oluşumuna bağlı olarak hücrelerde büyüme ve bazende parçalanma görülür. Çekirdek zaman zaman merkezci özelliğini kaybederek hücre zarına yaklaşır. Nukleus hücrenin idare merkezi olduğundan buradaki düzenin bozulması, diğer kısımlarında etkiler. Sitoplazma büzülür, hücre sitoplazmik uzantılarını kaybederek küresel veya elipsoid bir şekil alır. Oluşan virüslerin zarf kazanarak hücre dışına çıkmaları da hücrelerin parçalanarak ölmelerine neden olur. Yapılan çalışmalarda, hücrenin çekirdeği içinde bulunan hücre iskeletleri, elementleri, virüs proteinleri ve virüs DNA’sının biraraya gelmesiyle oluşan ve virojenik stroma olarak bilinen yapıların varlığı görülmektedir.

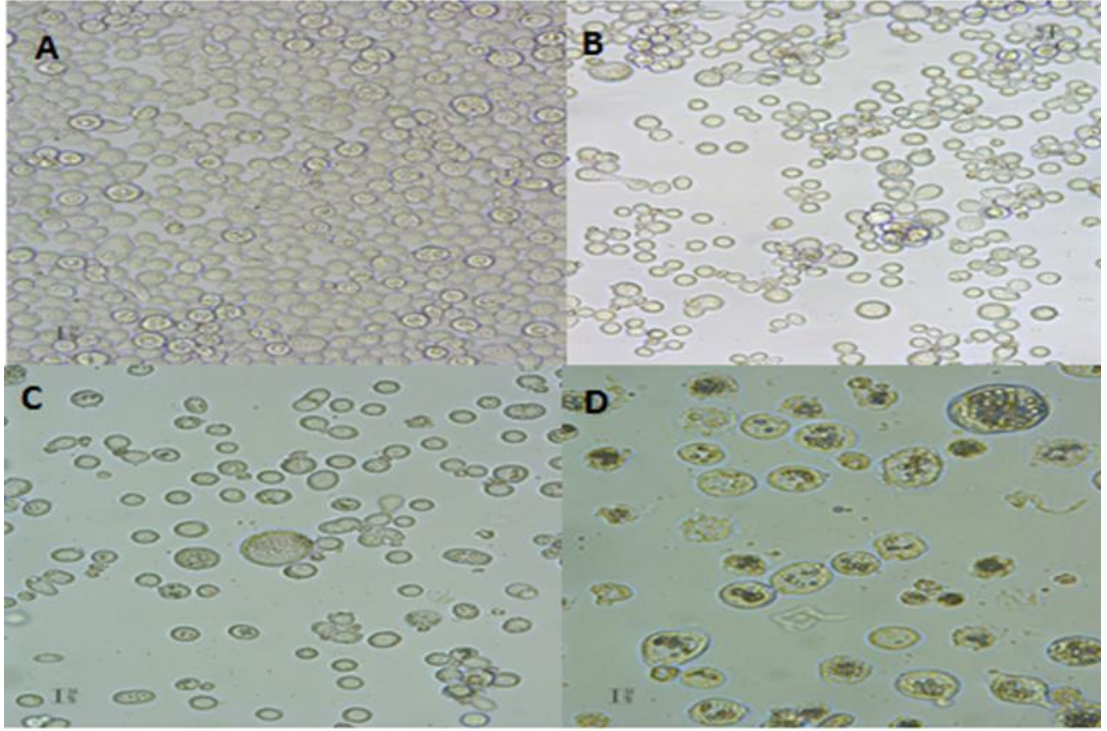
Çalışmada arı yuvası numunelerinden hazırlanan ekstraktlar, A (etanol), B (aseton), C (petrol eteri) olarak adlandırılmıştır. Arı yuvasının etanol ekstraktından uygulanan konsantrasyonlar A1: 25 mg/ml ve A2: 50 mg/ml olarak, aseton ekstraktından uygulanan konsantrasyonlar B1: 25 mg/ml B2: 50mg/ml olarak ve petrol eteri ekstraktından C1: 25 mg/ml C2: 50 mg/ml olarak uygulanmıştır. Arı yuvası numunesinin etanol ekstraktının (A), A1: 25 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı, AcMNPV ile enfekte olmuş Sf hücreleri Şekil 4.5’de gösterilmiştir. 25 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı hücreler bakulovirüsler ile enfekte olduğunda ilk 24 saatte (Şekil 4.5 B) hücre yoğunluğunda azalma olduğu, 48. saatte (Şekil 4.5 C) hücrelerin içerisinde parlak şekilde PIB yapıları olduğu ve hücrelerin yer yer çok az bir kısmının sitoplazmik uzantılara sahip olduğu gözlenmiştir. 72. saatte (Şekil 4.5 D) hücrelerin çekirdeklerinde PIB’lerin çok daha belirginleştiği, PIB oluşumuna bağlı olarak da hücrelerde büyüme ve bazı hücrelerde ise parçalanma meydana geldiği gözlenmiştir. A2: 50 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı, AcMNPV ile enfekte olmuş Sf hücreleri ise Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Burada ise 50 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı hücreler bakulovirüsler ile enfekte olduğunda ilk 48 saatte (Şekil 4.6 C) hücre yoğunluğunda azalma olduğu ve yine hücrelerin içerisinde PIB yapıları olduğu gözlenmiştir. 72. saatte (Şekil 4.6 D) hücrelerin



çekirdeklerinde PIB'lerin daha da belirginleştiği, PIB oluşumuna bağlı olarak da hücrelerde büyüme meydana geldiği gözlenmiştir. Kontrol 1'e göre A1 (25 µg/ml) konsantrasyonundaki hücrelerde yoğunluk azaldığı, A2 (50 µg/ml) konsantrasyonda ise yoğunluğun geç azaldığı gözlenmiştir. Bu durumda uygulanan arı yuyvası etanol ekstraktının konsantrasyonu arttıkça hücrelerin yoğunluğunun az miktarda azaldığı ve dayanıklılığının arttığı söylenebilir. Virüsün hücrelerle karşılaştığında Kontrol 2'ye göre A1 konsantrasyonunda hücrelere etki etmesini az oranda geciktirmiş ve A2 de A1 e göre daha fazla oranda geciktirmiştir. Sonuç olarak Kontrole 1 ve 2'ye göre, Sf hücresine uygulanan A1 konsantrasyonlu arı yuyvası ekstraktının bakulovirüsün Sf hücresi üzerindeki sitopatik etkileri az miktarda azalttığı ve enfeksiyonu geciktirdiği, A2 konsantrasyonlu ekstraktın daha fazla miktarda azalttığı ve enfeksiyonu geciktirdiği, A2'nin A1 konsantrasyonlu ekstrakta göre ise enfeksiyonu 24 saat kadar daha geciktirdiği ve azalttığı, sitopatik etkileri daha fazla oranda azalttığı gözlenmiştir.



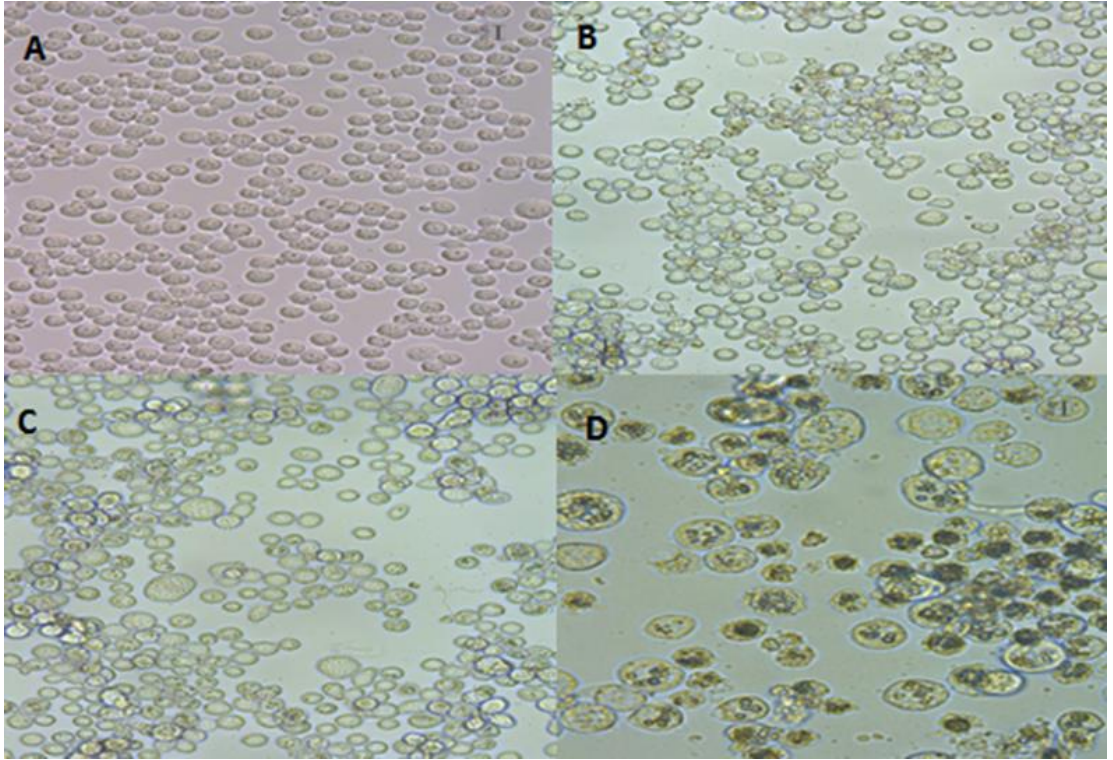
**Şekil 4.5** Arı Yuvası Numunesi Etanol Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon A1: 25 µg/ml, Sitopatik Etki Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir



**Şekil 4.6** Arı Yuvası Numunesi Etanol Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon A2: 50 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir

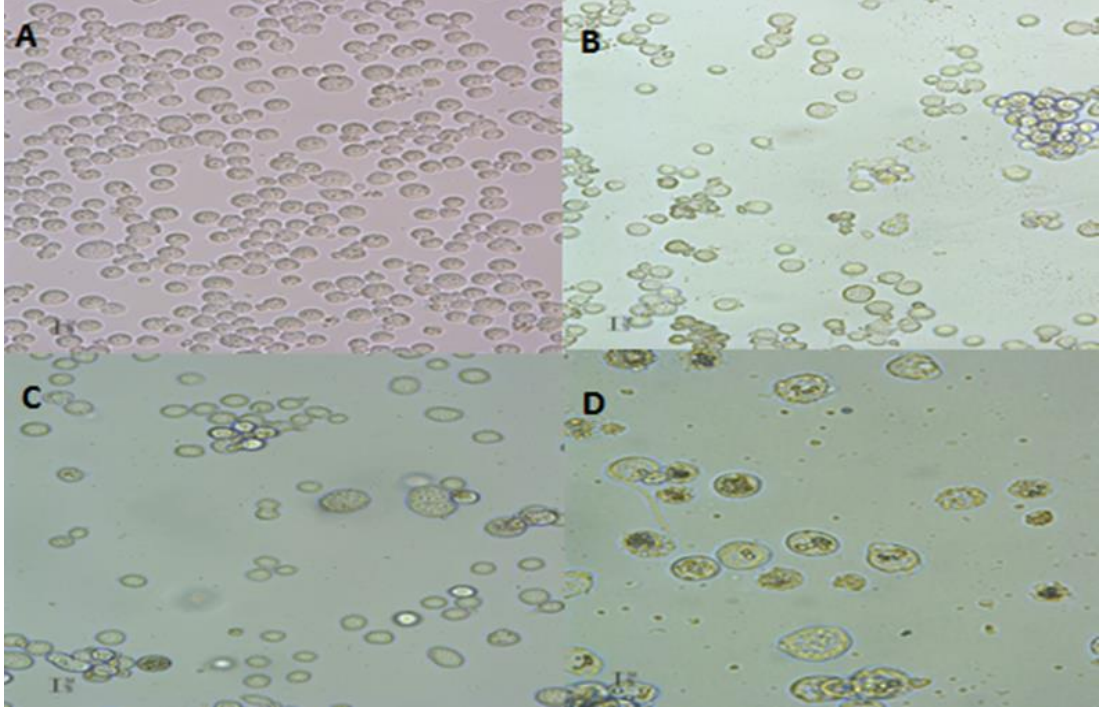
Arı yuvası numunesinin aseton ekstraktının (B) B1: 25 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı, AcMNPV ile enfekte olmuş Sf hücreleri Şekil 4.7 'de gösterilmiştir. 25 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı hücreler bakulovirüsler ile enfekte olduğunda ilk 24 saatte (Şekil 4.7 B) sitopatik etkilerin gözlenmediği herhangi bir değişikliğin olmadığı, 48. saatte (Şekil 4.7 C) bazı hücrelerin sitoplazma kısımlarının koyulaşmaya başladığı gözlenmiştir. 72. saatte (Şekil 4.7 D) PIB yapılarının oluşmaya başladığı hücrelerin çekirdeklerindeki PIB oluşumuna bağlı olarak hücrelerde büyüme meydana geldiği gözlenmiştir. B2: 50 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı, AcMNPV ile enfekte olmuş Sf hücreleri ise Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Burada ise 50 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı hücreler bakulovirüsler ile enfekte olduğunda ilk 24 saatte (Şekil 4.8 B) hücre yoğunluğunda büyük oranda azalmanın olduğu gözlenmiştir. 48.saatte hücre yoğunluğunda ki azalmanın devam ettiği, 72. saatte (Şekil 4.8 D) hücrelerin çekirdeklerinde PIB yapıların az oranda oluştuğu, PIB oluşumuna bağlı olarak da hücrelerin çok az kısmında büyüme meydana geldiği gözlenmiştir. Kontrol 1'e göre B1 (25 µg/ml) konsantrasyonunda ki hücrelerde yoğunluğun 24 saatte çok az oranda azaldığı, B2 (50 µg/ml)

konsantrasyonda ise hücre yoğunluğunun Kontrol 1'e göre büyük oranda azaldığı gözlenmiştir. Bu durumda uygulanan arı yuvası aseton ekstraktının konsantrasyonu arttıkça hücrelerin yoğunluğunun azaldığı söylenebilir. Virüsün hücrelerle karşılaştığında Kontrol 2'ye göre B1 konsantrasyonunun uygulandığı hücrelerde, normal sitopatik etkilerin az oranda meydana geldiği, B2 konsantrasyonunda da çok daha az oranda ve geç meydana geldiği gözlenmiştir. B2'nin B1'e göre sitopatik etkileri daha fazla oranda azalttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak Kontrol 1 ve 2'ye göre, Sf hücrelerine uygulanan B1 konsantrasyonlu arı yuvası ekstraktının bakulovirüsün Sf hücresi üzerindeki sitopatik etkileri azalttığı ve enfeksiyonu geciktirdiği, B2 konsantrasyonlu ekstraktın ise B1 konsantrasyonlu ekstrakta göre enfeksiyonu daha fazla geciktirmiş ve sitopatik etkileri daha fazla oranda azalttığı gözlenmiştir.



**Şekil 4.7** Arı Yuvası Numunesi Aseton Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon B1: 25 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir

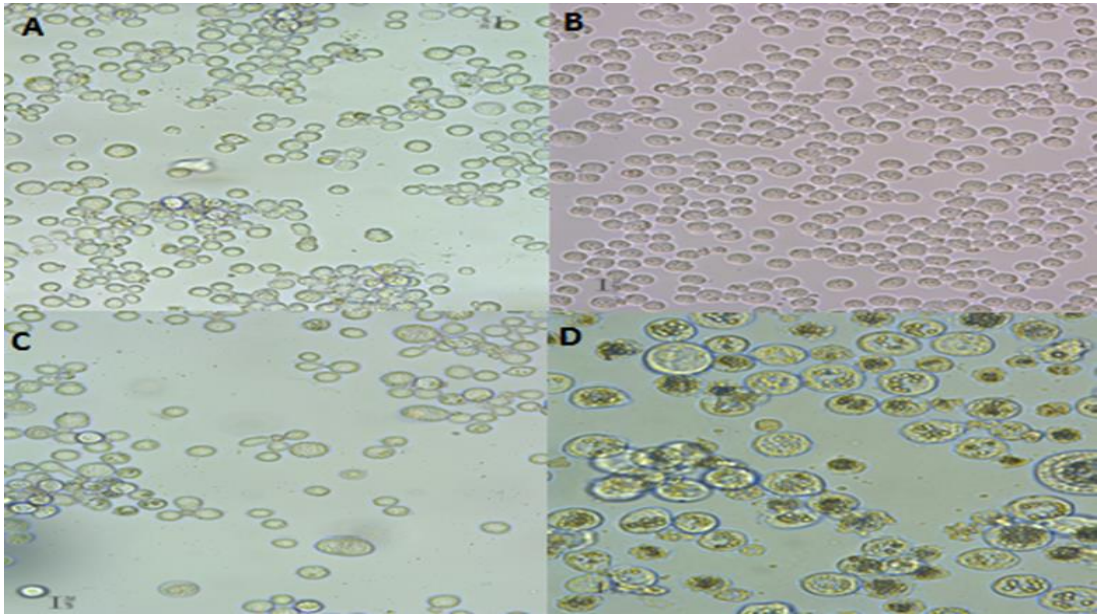




**Şekil 4.8** Arı Yuvası Numunesi Aseton Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon B2: 50 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µm. PIB Yapıları Göstermektedir

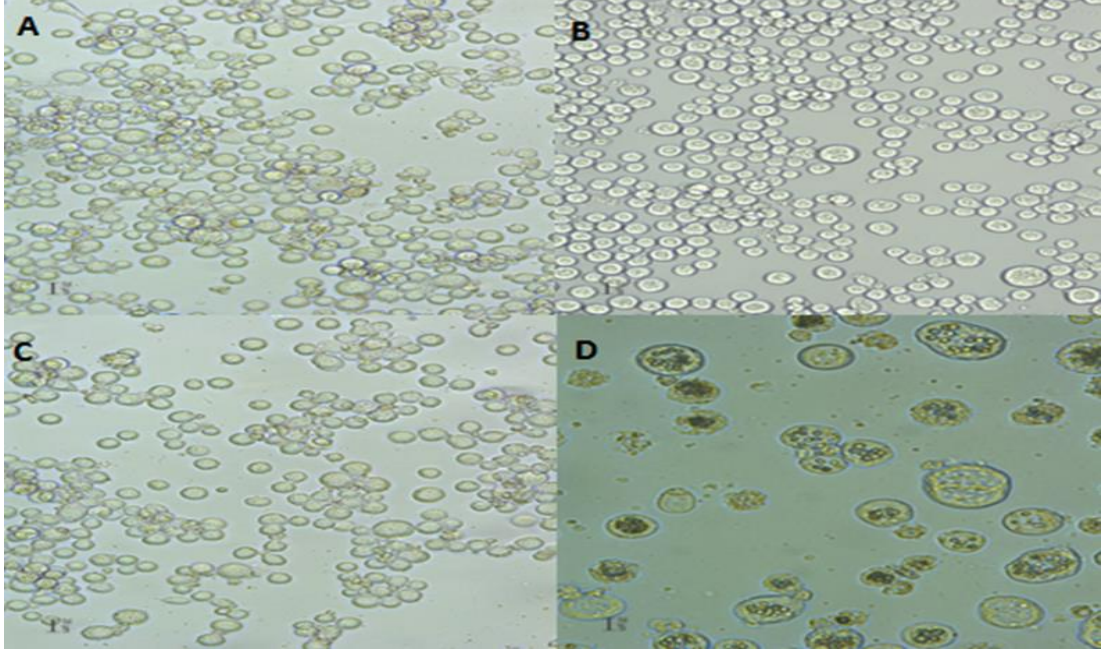
Arı yuvası numunesinin petrol eteri ekstraktının (C) C1: 25 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı, AcMNPV ile enfekte olmuş Sf hücreleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. 25 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı hücreler bakulovirüsler ile enfekte olduğunda 24 saatte (Şekil 4.9 B) sitopatik etkilerin olmadığı ve herhangi bir farklılığın olmadığı, 48. saatte (Şekil 4.9 C) hücre yoğunluğunda fazla oranda azalmanın meydana geldiği, 72. saatte (Şekil 4.9 D) hücrelerin sitoplazma kısımlarının koyulaşmaya başladığı, PIB yapılarının oluşmaya başladığı ve buna bağlı olarak hücrelerde büyüme meydana geldiği fakat parçalanma olmadığı gözlenmiştir. PIB yapıların bulunduğu ve hücre sayısında artış olduğu gözlenmiştir. C2: 50 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı, AcMNPV ile enfekte olmuş Sf hücreleri ise Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Burada ise 50 µg/ml konsantrasyonunun uygulandığı hücreler bakulovirüsler ile enfekte olduğunda ilk 24 saatte (Şekil 4.10 B) hücre yoğunluğunda sabit seyrettiği gözlenmiştir. 48. saatte hücre yoğunluğunun yine sabit olduğu, sitopatik etki gözlenmediği tespit edilmiş, 72. saatte (Şekil 4.10 D) hücreler de büyüme meydana geldiği, çekirdeklerinde PIB'lerin az oranda oluştuğu, PIB oluşumuna bağlı olarak da hücrelerin az kısmında ve az oranda büyüme meydana

geldiği ancak parçalanmanın olmadığı gözlenmiştir. Kontrol 1'e göre C1 (25 µg/ml) konsantrasyonunda ki hücrelerde yoğunluğun değişmediği aynı oranda seyrettiği 48. saatte az oranda bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir. C2 (50 µg/ml) konsantrasyonda ise hücre yoğunluğunun Kontrol 1'e göre aynı oranda sabit seyrettiği ve 72. saatte bir azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu durumda uygulanan arı yuyvası petrol eteri ekstraktının konsantrasyonu arttıkça hücrelerin yoğunluğunda fazla bir değişikliğin olmadığı ancak konsantrasyon arttıkça hücrelerin dayanıklılığının arttığı söylenebilir. Virüsün hücrelerle karşılaştığında Kontrol 2'ye göre C1 konsantrasyonunun uygulandığı hücrelerde, normal olan sitopatik etkilerin çok az oranda meydana geldiği. C2 konsantrasyonunda da çok daha az oranda ve oldukça geç meydana geldiği gözlenmiştir. C2'nin C1'e göre sitopatik etkileri hemen hemen yakın oranlarda fazla miktarda azalttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak Kontrole 1 ve 2'ye göre, Sf hücrelerine uygulanan C1 konsantrasyonlu arı yuyvası petrol eteri ekstraktının bakulovirüsün Sf hücresi üzerindeki sitopatik etkileri azalttığı ve enfeksiyonu oldukça geciktirdiği, C2 konsantrasyonlu ekstrenin ise C1 konsantrasyonlu ekstreye göre enfeksiyonu daha fazla geciktirmiş ve sitopatik etkileri daha fazla oranda azalttığı gözlenmiştir.



**Şekil 4.9** Arı Yuyvası Numunesi Petrol Eteri Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon C1: 25 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir





**Şekil 4.10** Arı Yuvası Numunesi Petrol Eteri Ekstraktının AcMNPV'nin *S. frugiperda* Hücrelerindeki Replikasyonuna Etkileri. Kullanılan Konsantrasyon C2: 50 µg/ml, İnkübasyon Süreleri A: 0 Saat, B: 24 Saat, C: 48 Saat, D: 72 Saat. Büyütme 20 µmx. PIB Yapıları Göstermektedir

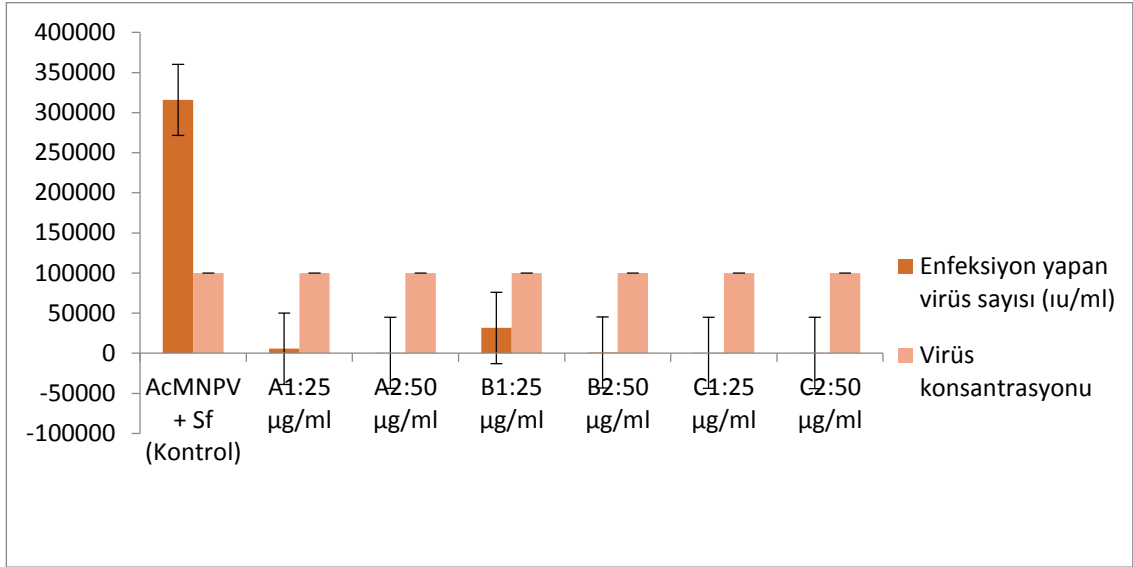
### 4.3 Arı Yuvasının Virüs Üretimi Üzerine Etkilerinin Tayini

Yapılan çalışmada seyreltilmiş arı yuvası ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerdeki AcMNPV'nin replikasyonları sonucu oluşan virüs sayıları (enfeksiyon yapan virüs sayısı=iu/ml) tespit edilmiştir. Bu amaçla çalışmada kullanılan üç farklı ekstrakt için daha öncede virüsün sitopatik etkilerinin belirlenmesi çalışmasında da belirtildiği gibi yuva ekstraktlarının uygulandığı hücrelerde parçalanma olmayan ve hücreler üzerinde çok olumsuz stres meydana gelmeyen konsantrasyon olarak en uygun konsantrasyon miktarları 25 ve 50 µg/ml olarak belirlenmiş ve değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmada A (etanol), B (aseton), C (petrol eteri) olarak adlandırılmış ve etanol ekstraktından uygulanan konsantrasyonlar A1: 25 mg/ml ve A2: 50 mg/ml olarak, aseton ekstraktından uygulanan konsantrasyonlar B1: 25 mg/ml B2: 50mg/ml olarak ve petrol eteri ekstraktından C1: 25 mg/ml C2: 50 mg/ml olarak uygulanmıştır. 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonundaki yuva ekstraktlarının uygulandığı gözlerden alınan besiyeri-virüs süspansiyonunda virüs sayımı Reed ve Muench (1992) metoduna göre yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11 ve Çizelge 4.3'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.3** Farklı Konsantrasyonlarda Arı Yuvası Ekstraktlarının Virüs Üretimi Üzerine Etkileri

Numune Adı		Enfeksiyon yapan virüs sayısı (iu/ml)	Konsantrasyondaki değişme (%)
AcMNPV+ Sf (Kontrol)		$3.16 \times 10^{10}$	-
A	A1:25µg/ml	$5.61 \times 10^8$	-%33.33
	A2:50µg/ml	$6.81 \times 10^7$	-%40
B	B1:25µg/ml	$3.16 \times 10^9$	-
	B2:50µg/ml	$10 \times 10^7$	-%75
C	C1:25µg/ml	$6.81 \times 10^7$	-%40
	C2:50µg/ml	$3.16 \times 10^7$	-

(+) Virüs üretimindeki artışı, (-) Virüs üretimindeki azalmayı göstermektedir.



**Şekil 4.11** Arı Yuvası Ekstraktlarının Farklı Konsantrasyonlarının Virüs Üretimi Üzerine Etkileri

Yapılan çalışmada hesaplamalar sonucunda, arı yuvasından elde edilen numunenin etanol ekstraktının 25µg/ml konsantrasyondaki virüs sayısını kontrole (AcMNPV + Sf) oranla %33.33 oranında azaltıcı etki gösterdiği gözlenmiştir. Aynı şekilde numunenin etanol ekstraktının 50 µg/ml konsantrasyondaki virüs sayısını ise

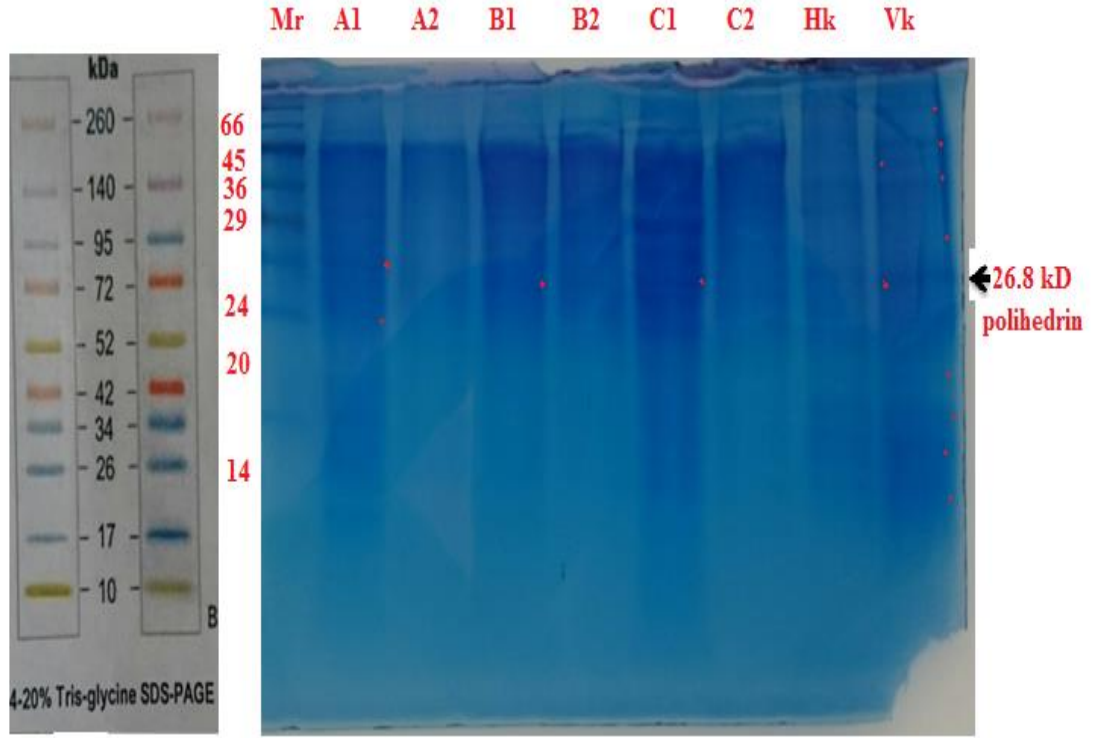
kontrole oranla %40 oranında azaltıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Arı yuvası numunesinden elde edilen numunenin aseton ekstraktının 25 µg/ml konsantrasyondaki virüs sayısı üzerinde kontrole (AcMNPV + Sf ) oranla herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı tespit edilmiş olup aynı şekilde numunenin aseton ekstraktının 50 µg/ml konsantrasyondaki virüs sayısını kontrole oranla %75 oranında azaltıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Arı yuvası numunesinden elde edilen petrol eteri ekstraktının 25 µg/ml konsantrasyondaki virüs sayısını kontrole (AcMNPV + Sf) oranla %40 oranında azaltıcı etki gösterdiği fakat aynı şekilde etanol ekstraktının 50 µg/ml konsantrasyondaki virüs sayısını ise kontrole oranla etkilemediği tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre, çalışmada kullanılan arı yuvası numunelerinin etanol, aseton ve petrol eteri ekstraktlarının içerisinde virüs üretimini en çok azaltan aseton ekstraktı olup %75 oranında 50 µg/ml konsantrasyonudur. En az azaltan ise etanol ekstraktının %33.33 oranında 25 µg/ml konsantrasyonudur.

#### **4.4 Virüsün Protein Sentezi Üzerine Olan Etkileri**

Çalışmanın bu kısmında üç farklı (etanol, aseton, petrol eteri) arı yuvası ekstraktlarının uygulandığı *Autographa californica* Multikabsid Nükleer Polihedrozis Virüs (AcMNPV) ile enfekte olmuş Sf hücrelerinde, AcMNPV'ye ait spesifik proteinlerde meydana gelen değişikliklerin polikrilamid jel elektroforez (PAGE) ile tespit edilmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla çalışmada kullanılan arı yuvası ekstrakt seyreltiklerinin 25 ve 50 mg/ml'lik yoğunluklardaki solüsyonları kullanılmış ve etanol ekstraktından uygulanan konsantrasyonlar A1: 25 mg/ml ve A2: 50 mg/ml olarak, aseton ekstraktından uygulanan konsantrasyonlar B1: 25 mg/ml B2: 50mg/ml olarak ve petrol eteri ekstraktından C1: 25 mg/ml C2: 50 mg/ml olarak uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan eşek arı yuvası etanol, aseton ve petrol eteri ekstraktlarının her birinden 25 ve 50 µg/ml yoğunluğundaki seyreltiklerin uygulandığı hücre-virüs süspansiyonundan hücre ve virüs protein numuneleri King ve Possee (1992) tarafından hazırlanan metoda göre hazırlanmıştır. Bu protein numuneleri SDS-PAGE'de ayrıştırılmıştır (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.4).



**Şekil 4.12** Farklı Çözücülerde Ekstrakte Edilmiş Eşek Arısı Yuvası Numunelerinin *Spodoptera frugiperda* (Sf) Hücrelerinde AcMNPV'nin Ürettiği Protein Bantlarının Belirlenmesi. A1: 25 mg/ml, A2: 50 mg/ml B1: 25 mg/ml, B2: 50 mg/ml, C1: 25 mg/ml C2: 50 mg/ml, Hk Hücre Kontrolü, Vk Virüs Kontrolü, Mr: Marker *Autographa californica* İle Enfekte Olmuş *Spodoptera frugiperda* (Sf) Hücresi %12 SDS Poliakrilamid Jelde Nükleer Polihedroz Virüsü (NPV) Olarak Gösterilmektedir

Arı yuvası ekstraktlarının virüs protein sentezi üzerine olan etkilerinin SDS-PAGE'de analizinde *Spodoptera frugiperda* (Sf) hücrelerinin yukarıda belirtilen arı yuvası ekstrakt konsantrasyonlarının mevcudiyetinde *Autographa californica* Multikabsid Nükleer Polihedrozis Virüs ile enfeksiyonu esnasında sentezlenen virüs proteinlerinin %12'lik SDS-PAGE'de analizi yapılmıştır. Herbir hatta arı yuvası ekstraktlarından 10 µl yüklenmiştir. Hücre kontrolünde (Hk) (enfekte olmamış Sf hücreleri) bulunmayan fakat virüs kontrolünde (Vk) (AcMNPV ile enfekte olmuş Sf hücreleri) mevcut olan virüse ait 3 tane farklı protein bandının olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.12).

**Çizelge 4.4** AcMNPV İle Enfekte Olmuş Sf Hücrelerinin Ekstraktlarında Polihedrin Bantlarının Varlığı %12 SDS Poliakrilamid Jelde Nükleer Polihedroz Virüsü (NPV)

Numune	Polihedrin Protein Bantının Varlığı	
Sf	Kontrol Hk	yok
Sf + AcMNPV	Kontrol Vk	var
Sf + AcMNPV	A1	yok
Sf + AcMNPV	A2	yok
Sf + AcMNPV	B1	var
Sf + AcMNPV	B2	yok
Sf + AcMNPV	C1	var
Sf + AcMNPV	C2	yok

Bununla birlikte, Vk'de mevcut bu protein bantlarının (virüse ait proteinlerin) uygulanan aseton ekstraktının B1: 25 mg/ml konsantrasyonunda ve uygulanan petrol eteri ekstraktının C1: 25 mg/ml konsantrasyonunda rastlanmıştır. Özellikle virüse ait olan bu proteinlerden en yoğun olarak üretilen proteinin polihedrin proteini olduğu tespit edilmiştir. Bu protein bandı kolay görünmektedir. Söz konusu protein bandı arı yuvası numunesinin aseton ve petrol eteri ekstraktlarının 25 mg/ml yoğunluğundaki aynı konsantrasyonlarında ekstraktının uygulandığı örneklerde de gözlenmiştir. Bununla birlikte, arı yuvası numunesinin etanol, aseton ve petrol eteri ekstraktının uygulanan A1: 25 mg/ml, A2: 50 mg/ml, B2: 50 mg/ml, C2: 50 mg/ml konsantrasyonlarında polihedrin proteini tespit edilememiştir (Çizelge 4.4).

#### **4.5 Arı Yuvası Ekstraktının Hidroksil Radikal Aracılı DNA Hasarı Üzerine Etkisi**

Çalışmada arı yuvası ekstraktlarının DMSO içerisindeki çözeltileri farklı konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra plazmit DNA ile inkübasyona bırakılmış ve agaroz jel elektroforezde yürütülerek etkileşim belirlenmiştir (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13** Farklı Konsantrasyonlarda Arı Yuvası Ekstraktları İle İnkübe Edilen pUC18 Plazmid DNA'nın Jel Elektroferez Görüntüleri. 1: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA. 2: TE Kontrol pUC18 Plazmid DNA. 3: DMSO Kontrol pUC18 Plazmid DNA. 4: pUC18 Plazmid DNA. 5: 6.25 mg/ml Arı Yuvası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA. 6: 12,5 mg/ml Arı Yuvası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA. 7: 25 mg/ml Arı Yuvası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA. 8: 50 mg/ml Arı Yuvası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ve pUC18 Plazmid DNA

Reaktif oksijen türlerinin DNA ve lipoprotein gibi önemli biyomoleküller üzerinde neden olduğu oksidatif hasara karşı antioksidanlar önemli koruyucu mekanizmalardır. Bu kapsamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin plazmid DNA üzerinde sebep olduğu kırıklar üzerine arı yuvasının koruyucu rolü araştırılmıştır.

Plazmid DNA jel elektroferezinde iki bant şeklinde görülür. Önde olan süpersarmal DNA (Form I), arkada kalan ise çentik oluşmuş DNA (Form II) sonra da doğrusal form III DNA olarak adlandırılmaktadır. Yapılan bu çalışmada görülen jel elektroferezinde 1. kuyu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontrol olarak belirlenmiştir. 2. kuyu TE tamponu kontrolü, 3. kuyu DMSO kontrol, 4. kuyu plazmid DNA, 5-8 kuyuları ise arı yuvası ekstraktı ile inkübasyona bırakılmış pUC18 plazmid DNA'sıdır ve 5'den 8'e doğru konsantrasyonlar 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml olacak şekilde artmaktadır. Yapılan çalışmada artan konsantrasyona bağlı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin DNA üzerinde vermiş olduğu zararın baskılandığı görülmektedir. Arı yuvası ekstraktının artan konsantrasyonuna bağlı olarak Form II bandının yoğunluğunda azalma olduğu gözlemlenmiştir. En düşük konsantrasyon olan 5. kuyu (6.25 mg/ml), 1. kuyu yani kontrol grubuna benzer bir şekilde kırık oluşturmuş, form I yapısının form II yapısına dönüştüğü görülmüştür. Fakat artan konsantrasyon doğrultusunda özellikle 8. kuyuda

(50 mg/ml) form II yapısında tekrar azalma olduğu görülmüştür. 4. kuyuda sadece plazmit olan kuyu ile benzer şekilde bir bant profili sergilediği görülmüştür (Şekil 4.13) Bu durumun arı yuvasının antioksidan özelliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

#### 4.6 GC-MS Analizi İle Biyoaktif Bileşenler Tayini

Yapılan GC-MS analizlerinin sonuçlarına göre, analiz edilen arı yuvası ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerin listesi fonksiyonel gruplara ayrılarak Çizelge 4.5'da verilmiştir. % alan olarak değerlendirilen analiz sonuçlarında incelenen arı yuvası ekstraktlarında toplam 43 farklı biyokimyasal bileşen olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşenlerin tamamının alıkonma zamanları ve % alanları (>%0.1) gösterilmiştir.

**Çizelge 4.5** *V. crabro* Yuva Ekstraktlarının GC-MS Analizi Sonuçları (>%0.1 Olan)

FONKSİYONEL GRUPLAR	<i>Vespa crabro</i>	
	R.T	%Alan
<b>Alkol</b>		
[4-(Aminomethyl)-2-cyclopentenyl]methanol	9.475	0.14
1-Heptadecanol (CAS)	20.458	0.41
1,7-Dihydroxy-1-deuteriospiro[5.5]undecane	26.458	0.07
2-Dodecanol (CAS)	40.717	0.53
1-Butanol, 4-butoxy- (CAS)	47.850	0.07
<b>Alkol (Alkinol)</b>		
2-Propyn-1-ol (CAS)	22.775	0.09
<b>Aromatik sübdtitüe alkol</b>		
Benzenemethanol (CAS)	24.467	0.71
<b>Doymamış alkol</b>		

**Çizelge 4.5** *V. crabro* Yuva Ekstraktlarının GC-MS Analizi Sonuçları (>%0.1 Olan)  
(Devamı)

FONKSİYONEL GRUPLAR	<i>Vespa crabro</i>	
	R.T	%Alan
<b>Doymamış alkol</b>		
(5S,8R)-5-Isopropyl-8-methyl-2-methylene-3,9-decadien-1-ol	26.500	0.05
(Z)-Non-2-en-4-yn-1-ol	26.617	0.04
<b>Siklik alkol</b>		
(1RS,2RS,4SR,5SR)-6-Oxabicyclo[3.1.0]hexane-2,4-diol	4.600	0.04
<b>Alkan</b>		
Heptadecane, 2-methyl- (CAS)	20.658	0.23
Pentane, 2,3,3,4-tetramethyl	24.017	0.30
Hexacosane	41.375	7.08
Pentatriacontane (CAS)	43.258	0.92
Hexacosane	46.500	6.31
Tricosane (CAS)	48.475	1.68
Nonadecane (CAS)	52.658	0.69
<b>Alken</b>		
(cis)-2-nonadecene	25.100	0.88
4-Methyl-2-Nitro-1-hexene	32.275	0.06
9-Tricosene, (Z)	45.858	35.87
(cis)-2-nonadecene	51.758	1.65
<b>Alken (Trien)</b>		
6(E),9(Z),13(E)-pendectriene	26.250	0.09
<b>Ester</b>		
Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS)	27.883	0.42
Heneicosanoic acid, methyl ester (CAS)	32.192	0.55
Nonahexacontanoic acid, methyl ester (CAS)	36.300	0.19



**Çizelge 4.5** *V. crabro* Yuva Ekstraktlarının GC-MS Analizi Sonuçları (>%0.1 Olan)  
(Devamı)

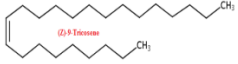
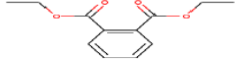

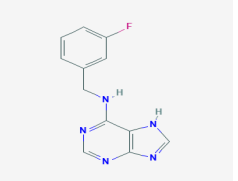

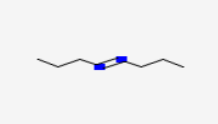
FONKSİYONEL GRUPLAR	<i>Vespa crabro</i>	
	R.T	%Alan
<b>Doymamış ester</b>		
(1R,4S,5R,6E)-2-Hydroxy-1-methylethyl bis(tertbutyldimethylsiloxy)-6-heptenoate	7-iodo-4,5 5.050	0.04
<b>Anorganik ester</b>		
Phosphorous acid, dibutyl ester	24.875	0.25
<b>Aromatik ester</b>		
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester (CAS)	25.242	13.21
<b>Aromatik keton</b>		
2,2,4-Triphenyl-2H-quinolin-6-one - 1-oxide	4.375	0.05
<b>Heterosiklik keton</b>		
2(1H)-Pyridinone	24.150	0.92
<b>Doymamış keton</b>		
3(2-PROPENYL)-5-HEXEN-2-ONE	25.692	0.29
<b>Eter</b>		
1,1-Dioctyloxyoctane	14.683	0.08
<b>Aldehit</b>		
Nonanal (CAS)	8.625	0.08
<b>Doymamış aldehit</b>		
Pent-4-enal	29.367	0.15
Pent-4-enal	43.958	0.23
1H-Purin-6-amine, [(2-fluorophenyl)methyl]- (CAS)	53.467	4.04
<b>Heterosiklik bileşik</b>		
3-Diaziridinamine, N,N,1,2,3-pentafluoro- (CAS)	23.983	0.09
Methanone, 1-(2-hydroxyphenyl)-1-(3,5,5-trimethyl-2-pyrazolin-1-yl)	25.500	0.71
3-(Benzyloxycarbonyl)-1-(p-toluenesulfonyl)-5,6-dihydro-2(1H)-2 pyridone	29.233	0.23

**Çizelge 4.5** *V. crabro* Yuva Ekstraktlarının GC-MS Analizi Sonuçları (>%0.1 Olan)  
(Devamı)

FONKSİYONEL GRUPLAR	<i>Vespa crabro</i>	
	R.T	%Alan
<b>Siklik bileşik</b>		
Cyclopentane, 1,1,3-trimethyl	46.033	0.25
<b>Aromatik bileşik</b>		
Benzene, 1,3-dimethyl- (CAS)	5.258	0.13
Benzene, 1,3-dimethyl- (CAS)	5.442	0.56
Benzene, 1,3-dimethyl- (CAS)	6.000	0.14
(tert-Butylsulfanyl)benzene	22.375	0.04
9-Amino-7-methyl-1,2,3,4-tetrahydroacridine	22.458	0.04
<b>Epoksit</b>		
4,7-Epoxytricyclo[4.1.0.0(3,5)]heptane	24.742	0.14
(S)-4-Iodo-1,2-epoxybutane	27.325	0.07
<b>Organik tellürit</b>		
5-hexenyl phenyl telluride	24.983	0.39

Çalışmada arı yuvası ekstraktları ile GC-MS analizi sonuçları % alanları olarak >%1 olan bileşenler değerlendirmeye alınmıştır. Formül ve kimyasal yapıları ile Çizelge 4.6'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.6** GC-MS Analizi Yapılan *V. crabro* Yuva Ekstraktlarının Biyokimyasal İçerikleri (>%1 Olan)

FONKSİYONEL GRUPLAR	%Alan	Formül	Kimyasal Yapı
<b>Alken</b>			
9-Tricosene, (Z)	35.87	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub>	
<b>Aromatik ester</b>			
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	13.21	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	
<b>Alkan</b>			
Hexacosane	7.08	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	
Hexacosane	6.31		
<b>Heterosiklik amin</b>			
1H-Purin-6-amine, [(2-fluorophenyl)methyl]	5.04	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>	
1H-Purin-6-amine, [(2-fluorophenyl)methyl]	4.04		
Purin-6-amine, [(2-fluorophenyl)methyl]	3.20		
<b>Alkan</b>			
Tricosane	1.68	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	
(cis)-2-nonadecene	1.65	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub>	

GC-MS analizi sonuçlarına göre arı yuvası ekstraktının farklı nispi bolluklarda kimyasal bileşenlere sahip olduğu gözlenmiştir. Bileşenlerin % alanları olarak >%1'in üzerinde olan Alkan, Alken, Aromatik ester, Heterosiklin amin fonksiyonel grupları elde edilmiştir. Arı yuvası ekstraktından en yüksek % alana sahip Hidrokarbonlar Alken fonksiyonel grubundan olan toplam %35.87 olarak (Z) 9-Trikozan bileşeni olarak belirlenmiştir. Diğer Aromatik ester grubundan olan %13.21 yüzde alana sahip 1,2-1,2 Benzensikarboksilik Asit, Dietil Ester bileşenidir, bu bileşen Benzensikarboksilik Asit, Dietil Ester, Dietil Fitalat, ftalik asidin dietil

esteridir. Diğeri Alkan grubundan olan %7.08 ve %6.31 olmak üzere toplamda %13.39 yüzde alana sahip Hekzakozan bileşeni olarak belirlenmiştir. Devamında Heterosiklin amin grubundan olan %5.04, %4.04, %3.20 olmak üzere toplam %12.28 yüzde alana sahip 1H-Purin-6-amine, [(2-florofenil)metil] bileşeni olarak belirlenmiş olup son olarak Alkan gurubundan olan %1.68 yüzde alana sahip Trikozan bileşeni ve en az yüzde alana sahip yine Alkan grubundan olan %1.65 yüzde alanı ile (cis)-2-nonadekan bileşeni belirlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Daha önce de belirtildiği gibi virüsler çoğalabilmeleri için canlı bir sisteme ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle virüslerin hücre içerisinde meydana getirdiği replikasyonları durdurmak zordur. Bununla birlikte virüslerin hücre içerisinde replikasyonlarını durduran birkaç etkin madde mevcuttur. Bu maddeler genellikle pürin ve pirimidin baz analoglarıdır. Bu antiviral ajanların virüsün hücre yüzeyine tutunmasını, protein kılıftan ayrılmasını engellediği, bazı antiviral ajanlarının ise mRNA sentezini durdurdukları bulunmuştur. Örneğin, amantanide (anti-viral ilaç) bazı virüslerin hücreye tutunmasını önler, idoksurudine DNA virüslerinin replikasyonlarını durdurur. Ribavirin muhtemelen mRNA sentezini engeller (Kılıçturgay ve ark 1992). Nancy ve John (1993) hiperisin ve rose bengal maddelerinin Friend leukemia virüsünü (FLV) inaktif hale getirdiklerini bulmuşlardır.

Bu bilgiler ışığı altında çalışmamızda kullandığımız eşek arısının yuvası ekstraktlarının içerdiği etkili madde veya maddelerden dolayı bakulovirüs'ün Sf hücre kültürlerinde meydana getirdiği replikasyon herhangi bir aşamada etkilenmektedir. Bu eşek arı yuvasının ihtiva ettiği etken maddelerin yukarıda sözü edilen antiviral maddelere benzer olabilmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada kullanılan virüs insanlarda enfeksiyon meydana getirmemekte ancak enfeksiyon meydana getiren DNA virüslerine iyi bir model teşkil etmektedir (King ve Possee, 1992). Yapılan bu çalışmada eşek arı yuvaları arıların çok farklı bitki türlerinden elde ettiği ve tükürük salgısından yapılmış olduğundan dolayı yuvalarının içerdiği biyolojik madde özellikleri belirlenmiş ve *Spodoptera frugiperda* hücre kültürlerinde bakulovirüs replikasyonları üzerine etkileri, antiviral özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca eşek arı yuvası ekstraktlarının antiviral analizleri ile ilgili literatür araştırmalarında daha önce yapılan bir çalışmaya rastlanılmamış olması çalışmanın özgünlüğü açısından önemlidir.

AcMNPV virüsü oldukça önemlidir, çünkü herpesvirüs, adenovirüs ve insanlarda aşı virüsü gibi diğer patojenik DNA virüsleri için iyi bir modeldir (Cochran ve Faulkner, 1983; Guarino ve ark., 1986). Bu bir tarama çalışması olduğundan, insanlara patojenik virüslerinden ziyade patojenik olmayan bir virüs kullanmak daha iyidir. Herhangi bir etkili ekstrakt belirlendikten sonra, bu madde saflaştırılabilir ve

patojenik DNA virüsleri üzerinde kullanılabilir. Öte yandan, çok farklı bitki özlerinden, bitki kabuklarından, çiçeklerinden ve köklerinden oluşan yuvanın özleri virüsün replikasyonlarını etkilemiş olduğu tespit edilmiştir. Farklı bölgelerden ve bitki florasının farklı olduğu yerlerden elde edilen eşek arı yuvası maddeleri değerlendirilebilir.

Bizim yaptığımız çalışmalar sonucunda ham arı yuvası ekstraktının uygulanan konsantrasyonlarda doz artışına bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı, sitotoksisteyi de doza bağlı olarak artırdığı gözlenmiştir. Yuva ekstraktının konsantrasyonu arttıkça canlı hücre sayısında düşüşler meydana gelmiş ve sitotoksistede artan konsantrasyonlara bağlı olarak Sf hücresi için oldukça toksik olduğu gözlenmiştir. Yuvanın antiviral analizinde, virüsün sitopatik etkilerinin belirlenmesi ile uygulanmış olan arı yuvası numunelerinin üç farklı (etanol, aseton ve petrol eteri) ekstraktlarının, 25 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda konsantrasyon arttıkça enfeksiyonun geciktiği ve azaldığı, sitopatik etkilerin daha fazla oranda azaldığı gözlenmiştir. Fakat bu etkiler farklı ekstraktlar için deneyde değerlendirilen zamanlar içerisinde farklı zamanlarda gözlenmiştir. Ekstraktlar arasında sitopatik etkileri en fazla oranda azaltan ekstrakt petrol eteri ekstraktı olarak gözlenmiştir. Yuvanın virüs konsantrasyonundaki virüs sayısını, uygulanan üç farklı arı yuvası ekstraktlarından aseton ekstraktının 50 µg/ml konsantrasyonu %75 oranda azaltarak en fazla etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Yuva ekstraktlarının virüsün protein sentezi üzerine olan etkilerinde polihidrin protein varlığı arı yuvası numunesinin aseton ve petrol eteri ekstraktlarının 25 mg/ml konsantrasyonlarının uygulandığı örneklerde de gözlenmiştir. Arı yuvası ekstraktının pUC18 plazmid DNA'sı ile etkileşiminde uygulanan konsantrasyonların artışına bağlı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin DNA üzerinde vermiş olduğu zararın düzeldiği görülmüştür. Bu durumun arı yuvasının antioksidan özelliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda arı yuvası ekstraktında en yüksek % alana sahip hidrokarbonlar alken fonksiyonel grubundan olan toplam %35.87 olarak (Z) 9-Trikozan bileşeni belirlenmiştir. Muscalure olarak bilinen (Z) -9-Trikozan karasinek gibi dipteran sineklerde bulunan bir böcek feromonudur. Dişiler erkekleri çiftleşmek için üretirler. Bayer tarafından Maxforce Quickbay'ta olduğu gibi böcek ilacı olarak kullanılır ve erkekleri üremelerini önlemek için tuzaklara çeker. (Z) -9-Trikozan erkekleri çekmek

için dişi ev sinekleri (*Musca domestica*) tarafından üretilen bir seks feromonudur. Arılarda, sallama dansı sırasında serbest bırakılan iletişim feromonlarından biridir (Thom ve ark. 2007). Bir diğeri aromatik ester grubundan olan %13.21 yüzde alana sahip 1,2-1,2 Benzensikarboksilik Asit, Dietil Ester bileşenidir. Benzensikarboksilik Asit, Dietil Ester, Dietil Ftalat, ftalik asidin dietil esteridir. Oda sıcaklığında sıvının sudan sadece biraz daha yüksek bir yoğunluğa sahip olduğu açık bir maddedir. Birçok organik molekül için yaygın olarak kullanılan bir çözücüdür ve kokuları ve kozmetikleri bağlamak için kullanılır. Spektrum tarafından tedarik edilen derecelendirilmemiş ürünler, genel endüstriyel kullanım veya araştırma amaçları için uygun bir kalitenin göstergesidir ve tipik olarak insan tüketimi veya terapötik kullanım için uygun değildir. Alkan grubundan olan toplamda %13.39 yüzde alana sahip Hekzakozan bileşeni belirlenmiş ve en az %1.68 yüzde alana sahip Alkan grubundan olan Trikozan bileşeni belirlenmiştir. Trikozan ve Hekzakozan *Apis Florea* bal arısına karşı kovucu aktivite göstermektedir (Naik ve ark., 2013).

Tıbbi bitkilerin ve bitkisel kaynaklı ürünlerin önemine baktığımızda, Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine göre, Dünya nüfusunun %80'i sağlık ihtiyaçlarını fitomedik kaynaklardan karşıladığı gerçeği ortaya çıkmaktadır. Bitkiler ve bitkisel ürünlerini tıbbi ihtiyaçlar için uygulayan ülkeler, tıbbi bitkilerin insanların sağlık ihtiyacına dahil edilmesini amaç belirleyen programlara, geleneksel tıbbi yoğun kullanan ülkeler, fitokimyasallardan modern ilaç keşfine yönelik bilimsel programlara sponsor olmalıdır. Bitkisel kaynaklı ürünlerin ve bitkilerin akıllıca kullanımı aşuların ve protein bazlı terapötiklerin üretimidir. Birkaç bilimsel rapor, bitkinin farmasötik dereceli peptitlerin /proteinlerin üretimi için iyi bir kaynak sunabileceğini düşündürmektedir. 1992 yılında HBV yüzey antijeni için ilk alt ünite aşısının ekspresyonundan bu yana, bitkilerde başka birçok farklı aşı antijeni başarıyla ifade edilmiştir ve bunların güvenliği hayvanlarda ve insanlarda değerlendirilmiştir. İnsan viral hastalıklarının tedavi etmek için bitkilerin ve bitkisel kaynaklı ürünlerin bu yönü göz önünde bulundurulurken, viral aşuların çoğunluğu zayıflatılmış veya inaktive edilmiş viral partiküllerden oluştuğundan dikkatli olunmalıdır. Bu sınırlamalar nedeniyle, bitkilerde virüs benzeri parçacıklar (VLP) olarak bir araya getirildiği ve doğada antijenik olduğu varsayılan farklı virüslerin kaplama proteinlerini ifade etmeye yönelik çabalar gösterilmiştir. Bitkilerde eksprese edilecek proteinin uygun

şekilde işlenmesi gibi diğer bazı konular da dikkate alınması gereken önemli hususlardır.

Her ne kadar bitkisel (şifalı bitkiler) preparatlar dünyanın çeşitli yerlerinde bireysel olarak veya kombinasyon halinde yaygın olarak kullanılsa da, tıbbi bitkilerin canlı sistem üzerindeki etkileşimleri hakkındaki veriler mevcut değildir. Sadece bir hastalığın tedavisi için belirli bir bitki / fitokimyasal ürün kullanan yerli halkın deneyimidir. Hepatotoksisiteye yol açan şifalı bitkilerin birlikte uygulanması gibi klinik bulgular, geleneksel tıbbi uygulayan sağlık hizmeti sağlayıcılarına sunulmalıdır. Genel olarak, bitkisel ilaçlar zararsız olarak algılanır, ancak bazı raporlar bitkisel ilaçlarla ilişkili hepatotoksisiteyi göstermektedir. Tıbbi bitki kullanımının sitotoksiteleri ile ilgili bilimsel raporların yayınlanmasına teşvik edilmeli ve evrensel bir veritabanı sistemine dahil edilmelidir. Ayrıca, insanların tedavisinde belirli bir bitkisel ilacın dahil edilmesinden önce daha büyük randomize, çift kör, plasebo kontrollü çok merkezli klinik çalışmalar yapılmalıdır.

Günümüzde ülkemizin ve tüm dünyanın karşı karşıya kaldığı koronavirüs pandemisinin oluşturduğu hastalık ve sosyal ekonomik etkiler ortadadır. Maalesef bu durumda insanlığı çaresiz kalmaktadır. Bugün ve gelecekte bu tür salgınların olması muhtemeldir. Bu sebepten dolayı bu tür çalışmalara hız verilmeli, virüslere karşı yapılacak olan aşı çalışmalarının tamamlanmasına yönelik araştırmaların hızlanması, çalışmaların ilerletilmesi ve tamamlanması sürecinde bu tür maddelerin tespiti oldukça önem taşımaktadır.



## 6. KAYNAKLAR

- Adams, J. R., & Bonami, J. R. (1991). Atlas of invertebrate viruses: Atlas of invertebrate viruses. Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, 269-280.
- Adams, J. R., & McClintock, J. T. (1991). Baculoviridae, nuclear polyhedrosis viruses Part 1, Nuclear polyhedrosis viruses of insects: Atlas of invertebrate viruses, Ed.: Adams, J. R., Bonami, J. R., Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, 87-204.
- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Balinsky, C. A., Moser, B. A., Becnel, J. J., Rock, D. L., & Kutish, G. F. (2001). Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *Journal of Virology*, 75, 11157-11165.
- Anonim, (2008). Böcek. <http://tr.wikipedia.org/wiki/B%C3%B6cek>-(Erişim tarihi: 30.07.2020).
- Bağrıaçık, N. (2011). Determination of some structural features of the nest paper of *Vespa orientalis* Linneaus science, 1771 and *Vespa crabro* Linneaus science, 1758 (Hymenoptera: Vespinae) in Turkey. *Archives of Biological Sciences*, 63(2), 449-455.
- Bambara, S. B., & Waldvogel, M. (1996). European hornets (*Vespa crabro* L.) entomology extension service. North Carolina, USA, 11pp.
- Bankova, V., Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Barbehenn, R. V., & Martin, M. M. (1995). Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *Journal of Insect Physiology*, 41, 301-311.
- Beljelarskaya, S. H. (2002). A baculovirus expression system for insect cells. *Journal of Molecular Biolog*, 36, 281-292.
- Bergold, G. H. (1963a). The molecular structure of some insect virus inclusion bodies. *Journal Ultrastructure Research*, 8, 360-378.
- Bergold, G. H. (1963b). The nature of nuclear polyhedrosis viruses: In *Insect Pathology: An Advance Treatise*, Ed.: Steinhaus, E. A., Academic Press, New York, 413-455.
- Bilimoria, S. L. (1991). The biology of nuclear polyhedrosis viruses: Viruses of invertebrates, Ed.: Kurstak, E., Marcel Dekker Inc., New York, 1-60.
- Bilimoria, S. L., Demirbag, Z., Ng, H., & Rainisch, A. J. (1992). Abortive cell culture infection of nuclear polyhedrosis viruses as model system for host specificity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 27, 123-141.
- Blissard, G. W., & Wenz, J. R. (1992). Baculovirus GP64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH dependent membrane fusion. *Journal of Virology*, 66, 6829-6835.
- Boeru, V., & Derevici, A. (1978). Some chemical and physical data on Romania propolis. Apimondia Publishing House, Bucharest, Romania, 19-26.
- Boucias, D. G., & Pendland, J. C. (1998). Baculoviruses: Principles of insect pathology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, 111-146.

- Brenda, T. S., Tapasya, B., & Lawrence, D. E. (2016). A review of silicon in soils and plants and its role in US agriculture: history and future perspectives. *Soil Science*, 181, 393–411.
- Bunn, D. S. (1988). The nesting cycle of the hornet *Vespa crabro* L. (Hymenoptera: Vespidae). *Entomologist's Monthly Magazine*, 124, 117-122.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363.
- Burleson, F. G., Chambers, T. M., & Wedbrauk, D. L. (1992). Cytopathic effect inhibition bioassay: Virology a laboratory manuel. Academic Press, INC., New York, 127-135.
- Campbell, N. A. (1993). Biology, The Benjamin Cummings Publishing Company. Inc Redwood City, California, 1190pp.
- Charles, J. F., Delecluse, A., & Nielsen-LeRoux, C. (2000). Entomopathogenic bacteria: From laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 522pp.
- Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology In Vitro*, 12, 251-258.
- Cochran, M. A., & Faulkner, P. (1983). Location of homologous DNA sequences interspersed at 5 region in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Journal of Virology*, 45, 961-970.
- Cox, C. S. (1989). Airborne bacteria and viruses. *Science Progress*, 73(4), 469–499.
- Daniels, R., Leslie, H., & Nicoll. (2011). Pharmacology-Nursing management: Contemporary medical-surgical nursing, Cengage Learning, 397pp.
- Davis, M. (2011). A hornet (*Vespa crabro*) steals prey from a spider (*Argiope aurantia*). *Southeastern Naturalist*, doi:10.1656/058.010.0119.
- Demir, İ. (2004). Hyphantria cunea nükleopolihedrovirüs'ünün *Spodoptera frugiperda* ve *Lymantria dispar* hücre kültürlerinde replikasyonunun karşılaştırılması. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
- Demir, İ., Nalçacıoğlu, R., Demirbağ, Z., Kılıç A. O., & Beldüz, A. O. (2000). Expression of cryIVA and cryIVD genes of *Bacillus thuringiensis* in baculovirus expression system: Insect pathogens and insect parasitic nematodes. *International Organisation for Biological and Integrated Control, West Palaearctic Regional Section Bulletin*, 23, 267-274.
- Demirbağ, Z. (1993). Comparative replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in abortive and productive infections of insect cell lines. Ph.D. Thesis , Graduat Faculty of Texas Tech University, Texas.
- Demirbağ, Z., Beldüz, A. O., & Demir, G. (1998). Bakuloviruslerin ekspresyon vektörü olarak biyoteknolojide kullanılması. *Türk Biyoloji Dergisi*, 21, 63-70.
- DSÖ, (2009). Antiviral use and the risk of drug resistance. www.who.int-(Erişim tarihi: 30.07.2020).

- Duman, R. (2012). Antiherpetic activity of some endemic *Hypericum* species in Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1240-1244.
- Efstathiou, S., & Preston, C. M. (2005). Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Researcher*, 11(2), 108–119.
- Elick T. A., Bauser, C. A., & Fraser, M. J. (1996). Excision of the piggyBac transposable element in vitro is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. *Genetica*, 98, 33-41.
- Engel M. S., & Schultz, T. R. (1997). Phylogeny and behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 90, 43-53.
- Engelhard, E. K., & Volkman, L. E. (1995). Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 209(2), 384–389.
- Ertürk, Ö. (2017). Determination of some structural features of the nest paper materials of *Dolichovespula saxonica fabricius*, 1793 (Hymenoptera: Vespinae) in Turkey. *Entomological Research*, 47, 286–294.
- Ertürk, Ö., & Bağdatlı, E. (2019). A comprehensive study on nest materials of *Vespa crabro* and *Polistes dominula*: chemical properties and biological characterization with antioxidant and antimicrobial activity. *Biologia*, 74, 797–812
- Ertürk, Ö., Çol Ayvaz, M., Can Z., Karaman, Ü., & Korkmaz, K. (2017). Antioxidant, antimicrobial activities and phenolic and chemical contents of *Physalis peruviana* L. from Trabzon, Turkey. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Researcher*, 51(3), 213-216.
- Evans, H. F. (1986). Ecology and epizootiology of baculoviruses: The biology of baculoviruses, Ed.: Granados, R. R., Federici, B. A., Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, 89–100.
- Federice, B. A. (1999). Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. *Methods in Biotechnology*, 5, 301-320.
- Flexner, J. L., & Belnavis, D. L. (2000). Microbial insecticides: Biological and biotechnological control of insect pest, Ed.: Rehcigl, J. E., Rehcigl, N. A., Lewis Publishers, Boca Raton, 35-62.
- Gad, S. C. (1999). Multiple chemical sensitivity: a moderator's viewpoint. *International Journal of Toxicology*, 18, 379-381.
- Garcia-Maruniak, A., Maruniak, J. E., Zannotto, P. M., Doumbouya, A. E., Liu, J. C., Merritt, T. M., & Lanoie, J. S. (2004). Sequence analysis of the genome of the neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 78(13), 7036–7051.
- Ghosh, S., Parvez, M. K., Banerjee, K., Sarin, S. K., & Hasnain, S. E. (2002). Baculoviruses as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy. *Molecular Therapy*, 6, 5-11.

- Greenspan, G. L., Corsaro, B. G., Hughes, P. R., & Granados, R. R. (1991). In-vivo enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper *trichoplusia lepidoptera noctuidae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(2), 203–210.
- Guarino, L. A., Gonzalez, M. A., & Summers, M. D. (1986). Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virüs. *Journal of Virology*, 60, 224-229.
- Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O., & Volkman, L. E. (2004). P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M. nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. *Journal of Virology*, 78, 6786–6791.
- Hames, B. D., & Rickwood, D. (1990). Gel electrophoresis of proteins second edition, Oxford University Press, London, 383pp.
- Harrap, K. A. (1972). The structure of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 50, 114-123.
- Harrison, R. L., & Bonning, B. C. (2000). Genetic engineering of biocontrol agents for insects: Biological and biotechnological control of insect pest, Ed.: Rechcigl, J. E., Rechcigl, N. A., Lewis Publishers, Boca Raton, 243-280.
- Hashimoto, Y., Corsaro, B. G., & Granados, R. R. (1991). Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni granulosis* virus. *Journal of General Virology*, 72(11), 2645–2652.
- Hayden, F. G., & Jong, M. D. (2011). Emerging influenza antiviral resistance threats. *Journal of Infectious Diseases*, doi:10.1093/infdis/jiq012.
- Heimpel, A. M., Thomas, E. D., Adams, J. R., & Smith, L. J. (1973). The presence of nuclear polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* on cabbage from the market shelf. *Environmental Entomology*, 2, 72-75.
- Herniou, E. A., Olszewski, J. A., Cory, J. S., & O'Reilly, D. R. (2003). The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology*, 48, 211–234.
- Heymann, D. L., & Aylward, R. B. (2006). Mass vaccination: when and why. *Current Topics Microbiology Immunology*, doi:10.1007/3-540-36583-4\_1.
- Hiscock, D., & Upton, C. (2000). Viral genome database: A tool for storing and analyzing genes and proteins from complete viral genomes. *Bioinformatics*, 16, 484-485.
- Hu, Y. C. (2006). Baculovirus vectors for gene therapy. *Advances in Virus Researcher*, 68, 287-320.
- Hunt, J. H., & Arduser, M. S. (1996). Common Missouri Wasps and Bees. Paper notes. Department of Biology University of Missouri-St. Louis, USA.
- Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F., & Crook, N. E. (1998). Insect viruses and pest management. John Wiley & Sons, Chichester.

- Ignoffo, C. M. (1981). Living microbial insecticides in: Essays in applied microbiology, Ed.: Norris, J. R., Richmond, M. H., John Wiley, New York, 2–31.
- Inceoglu, A. B., Kamita, S. G., Hinton, A. C., Huang, Q., Severson, T. F., Kang, K., & Hammock, B. D. (2001). Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Management Science*, 57, 981-987.
- Jacques, R. P. (1975). Persistence, accumulation, and denaturation of nuclear polyhedrosis and granulosis viruses, in: Baculoviruses for Insect Pest Control: Safety Considerations, Ed.: Summers, M. D., Engler, R., Falcon, L. A., Vail, P. V., American Society of Microbiology, Washington, DC, 90–99.
- Jasny, B. R. (1987). Insect viruses invade biotechnology. *Journal of Science*, 238, 1263-1563.
- Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Göral, G., & Helvacı, S. (1992). Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji, Karar Matbaası, İstanbul, 94-101.
- Kimberlin, D. W., & Whitley, R. J. (1996). Antiviral resistance: mechanisms, clinical significance and future implications. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, doi:10.1093/jac/37.3.403.
- King, L. A., & Possee, RD. (1992). The baculovirus expression system a laboratory guide, First Edition, The University Press, Cambridge, London, 230pp.
- Kisung, K., Tekoah, Y., Rudd, P. M., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Spitsin, S., Hanlon, C. A., Rupprecht, C., Dietzschold, B., Golovkin, M., & Koprowski, H. (2003). Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi:10.1073/pnas.0832472100.
- Kosmeier, D. (2013). "Hornets: Gentle Giants". (Retrieved 2014.09.30).
- Kost, T. A., & Condreay, J. P. (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology*, 20, 173-180.
- Krzyminska, S., Raczowska, M., & Kaznowski, A. (2010). Cytotoxic activity of *Serratia marcescens* clinical isolates. *Polish Journal Microbiology*, 59(3), 201-205.
- Kulike, H. (1986). Hornissen. *Imkerfreund*, 41, 300-303.
- Labanderia, C. C., & Sepkoski, J. J. (1993). Insect diversity in the fossil record. *Journal Science*, 261, 310–314.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., & Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?. *Biological Control*, 21, 230-248.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during in assembly of the head of bacteriophage  $\tau$ 4. *Nature*. 227, 608-685.
- Lauzon, H. A., Lucarotti, C. J., Krell, P. J., Feng, Q., Retnakaran, A., & Arif, B. M. (2004). Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of Virology*, 78(13), 7023–7035.

- Leikina, E., Onaran, H. O., & Zimmerberg, J. (1992). Acidic pH induces fusion of cells infected with baculovirus to form syncytia. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 304(2–3), 221–224.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., & McEachern, J. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS like coronaviruses. *Science*, 310(5748), 676–679.
- Martignoni, M. E., & Iwai P. J. (1986). A catalog of viral diseases of insects, mites and ticks, U. S. Department Agriculture Forest Service. PNW-195 General Technical Report, Pacific Northwest Researcher Station.
- Miller, L. K., & Ball, LA. (1998). The insect viruses. Plenum Press, New York, 413pp.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorometric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., & Summers, M. D. (1995). The Classification and Nomenclature of Viruses: Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Ed.: Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., & Summers, M. D Springer-Verlag. Wien, 205-207.
- Naik, D. G., Vaidya, H. S., & Namjoshi, T. P. (2013). Essential oil of Indian propolis: chemical composition and repellency against the honeybee *Apis florea*. *Chemistry Biodiversity*, 10, 649–657.
- Nancy, R. S., & John, L. (1993). Antiretroviral activities of hypericin and rose bengal photodynamic effects on friend leukemia virus infection of mice. *Antiviral Researcher*, 21, 119-127.
- Nijhuis, M., Van Maarseveen, N. M., & Boucher, C. A. (2009). Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. *Handbook of Experimental Pharmacology*, doi:10.1007/978-3-540-79086-0\_11.
- O'Brien, M. (1996). Check list of the social vespidae (vespinae and polistinae). Paper notes. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, MI, USA, 34-37.
- Odindo, M. O. (1983). Epizootiological observations on a nuclear polyhedrosis of the African armyworm *Spodoptera exempta* (Walk.). *Insect Science and Its Application*, 4(3), 291–298.
- Ohba, M., & Tanada, Y. (1983). A synergistic factor enhances the in vitro infection of an insect baculovirus. *Naturwissenschaften*, 70(12), 613–614.
- Özbek, H. (1988). Bazı yörelerimizde arıcılığı tehdit eden arı canavarı (*Philanthus triangulum abdelkader* Lep. (Hymmenoptera: Sphecidae)). *Türkiye Kalkınma Vakfı Teknik Arıcılık Dergisi*, 18, 2-5.
- Petcharawan, O., Paitoon, N., Sripaiboon, P., & Saelee, S. (2012). Antiviral activity of crude hexane extracts from *Allamanda cathartica* on the replication of

*Autographa californica* multiplem nucleopolyhedrovirus. *King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang*, 12(1), 21-29.

- Petcharawan, O., Suriyasakol, K., & Vicharncharoensuk, N. (2009). Cytotoxicity of crude extracts from golden trumpet (*Allamanda cathartica* L.) on Sf9 and KMITL-HA-E1 cell lines. *Study on Biological Control and Biotechnology*, Ed.: Qian, Y., Harbin, Heilongjiang Science and Technology Press, 101-107.
- Reed, L., & Muench, H. (1992). A simple method for estimating fifty percent endpoints, *Baculovirus Expression Vectors* Ed.: O'Reilly, D. R., Miller, L. K., Luckow, V.A., A Laboratory Manual, New York, W.H. Freeman and Company, 124-138.
- Rossignol, J. F. (2014). Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Research*, doi:10.1016/j.antiviral.2014.07.014.
- Schnitzler, P., Schön, K., & Reichling, J. (2001). Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Die Pharmazie*, 56(4), 343-7.
- Sezen, K., & Demirbağ, Z. (2005). Entomopoksvirüsler ve biyolojik kontrol. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(4), 280-286.
- Siddiqui, M. J., Ismail, Z., Aisha, A. F. A., & Abdul, A. M. S. (2010). Cytotoxicity activity of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) crude extracts and pure compounds against human colorectal carcinoma cell line. *International Journal of Pharmacology*, 6(1), 43-47.
- Sökmen, A. (2001). Antiviral and cytotoxic activities of extracts from the cell culture and respective parts of some Turkish medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 25, 343-350.
- Tanada, Y., & Kaya, H. K. (1993). *Insect Pathology*, Academic Press, San Diego, 1-12.
- Terra, W. R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B, 1-62.
- Theilmann, D. A., Blissard, G. W., Bonning, B., Jehle, J. A., O'Reilly, D. R., Rohrmann, G. F., Thiem, S., & Vlak, J. M. (2005). *Baculoviridae*, Eighth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses, Ed.: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A., Academic Press, San Diago, 177-185.
- Thom, C., Gilley, D. C., Hooper, J., & Esch, H. (2007). The scent of the waggle dance. *Public Library of Science Biology*, 5(9), e228.
- Tinsley, T. W., & Kelly, D. C. (1985). Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses: *Insecticides for Biological Control*, Ed.: Maramorosch, K., Sherman, K. E., Academic Press, Orlando, FL, 23-35.
- Ulrike L. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(3), 285-99.

- Uwo, M. F., Ui-Tei, K., Park, P., & Takeda, M. (2002). Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. *Cell and Tissue Research*, 308(2), 319–331.
- Van de Westeringh, C., & Veldstra, H. (1958). Researches on plant growth regulators, XXIV. Structure/activity, IX. Tetrazole derivatives. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 77, 1107–1113.
- Van der Vecht, J., (1957). The Vespinae of the Indo-Malayan and Papuan areas. *Zoologische Verhandelingen, Rijksmuseum, Natural History Leiden*, 1-83.
- Van der Vecht, J., (1959). Notes on oriental Vespinae. including some species from China and Japan. *Zoologische Mededelingen, Rijksmuseum Natural History Leiden*, 205-232.
- Van Oers, M. M. (2006). Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Advances in Virus Researcher*, 68, 193-253.
- Vlak, J. M., & Keus, F. J. A. (1990). Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines, *Advances in Biotechnological Processes: Viral Vaccines*, Ed.: Mizrahi, A., Wiley-Liss, New York, 91-128.
- Volkman, L. E., & Goldsmith, P. A. (1985). Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology*, 143(1), 185–195.
- Volkman, L. E., (1995). Baculovirus bounty. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy, Ed.: Ghosh, S., Parvez, M. K., Banerjee, K., Sarin, S. K., Hasnain, S. E., *Mol Ther*, 5-11.
- Von Hagen, H. H. (1987). Wissenswertes über unsere Hornisse (*Vespa crabro* L.). *ADIZ*, 4, 109-112.
- Wang, P., Hammer, D. A., & Granados, R. R. (1994). Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *Journal of General Virology*, 75(8), 1961–1967.
- Witte, C. P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180, 431–438.
- Yamane, S. (1974). On the genus *Vespa* from Nepal. *Japanese Journal of Entomology*, 42, 29-39.
- Yıldırım, E. (2012). The distribution and biogeography of Vespidae (Hymenoptera: Aculeata) in Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 36(1), 23-42.
- Yıldırım, E., & Gusenleitner, J. (2012). Contribution to the knowledge of the Vespidae (Hymenoptera: Aculeata) of Turkey, with a checklist of the Turkish species. *Turkish Journal Zoology*, 36(3), 361-374.
- Yıldırım, E., & Özbek, H. (1992). Vespidae (Hymenoptera: Vespoidea)'da iğne, zehirin yapısı ve fonksiyonu. *Doğu Anadolu Bölgesi I Arıcılık Semineri*, 3-4 Haziran, Erzurum.
- Yıldırım, E., & Özbek, H. (1993). Polistinae (Hymenoptera: Vespidae) of Turkey. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 17(3), 141-156.



Zanotto, P. M., Kessing, B. D., & Maruniak, J. E. (1993). Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: Evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62(2), 147–164.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Alev Çaldaş
Doğum Yeri	Ordu/Gölköy
Doğum Tarihi	05.03.1989
Uyruğu	● T.C. □ Diğer:
Telefon	05347680306
E-Posta Adresi	caldaslev2@gmail.com



Eğitim Bilgileri	
<b>Lisans</b>	
Üniversite	On Dokuz Mayıs Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	03.02.2017
<b>Yüksek Lisans</b>	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	...
<b>Yayınlar</b>	
<p>Ertürk, Ö., Taş, B., Şahin, H., &amp; Çaldaş, A. (2019). Determination of some structural features of the dud nest materials of <i>Sceliphron curvatum</i> (Smith, 1870), (Hymenoptera: Sphecidae) in Turkey. <i>Journal of the Entomological Research Society</i>, 21(2), 157-166.</p> <p>Ertürk, Ö., Çaldaş, A., &amp; Kolören, Z. (2018). The Antimicrobial Activity in Different Solvent of <i>Vespa crabro</i> Feces (Linnaeus, 1758), (Hymenoptera: Vespinae) in Turkey.</p> <p>2018-2020: TÜBİTAK 1001 – Bilimsel Ve Teknolojik Araştırma Projesi. Kuru Meyve Güvesi (<i>Plodia interpunctella</i> (Hübner), Lepidoptera: Pyralidae) ile Biyolojik Mücadelede Entomopatojenlerin Kullanılma Olanaklarının Belirlenmesi.</p>	