

Alüminyum oksitin *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarında total hemosit sayıları üzerine etkileri

Ayşe Kara¹ , Benay Tunçsoy² , Pınar Özalp^{1*} 

¹Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

²Adana Alparşlan Türkçe Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Adana, Türkiye

^{1*}Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

*Corresponding author : pozalp@cu.edu.tr

Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-2977-6334>

Received : 04/11/2020

Accepted : 25/12/2020

Özet: Ağır metaller, çevre kirliliğinin önemli etkenlerinden biridir. Ağır metal kirliliği sadece hayvanlarda büyüme, üreme, hayatta kalma ve metabolizma ile değil aynı zamanda doğuştan gelen bağışıklık sisteminde de zararlı etkilere neden olabilir. Yapılan çalışmada, *Galleria mellonella* son evre larvalarının birinci arka bacaklarına Al₂O₃ çözeltisinin farklı derişimleri (10, 50 ve 100 µg/mL) Hamilton enjektörü yardımıyla enjekte edilerek 2, 4 ve 8 saatlik sürelerle maruz bırakılmıştır. Uygulama sonunda kontrol ve deneme gruplarından alınan hemolenf örnekleri ile total hemosit sayısı belirlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, Al₂O₃ çözeltisine maruz bırakılan *G. mellonella* larvalarının maruz bırakılan etki sürelerinde total hemosit sayısında kontrole göre tüm konsantrasyonlarda azalma meydana gelmiş ve bu azalma istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. *G. mellonella* larvalarının total hemosit sayılarında meydana gelen bu değişimler, çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmede iyi bir model organizma olarak kullanılabilirliğini ve başka türler üzerinde de yapılacak immünolojik ve fizyolojik çalışmalara yol gösterebileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*, Alüminyum oksit, Total Hemosit Sayısı

Effects of Aluminum Oxide on Total Hemocyte Counts of Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae

Abstract: The heavy metals are one of the important factors of environmental pollution. Heavy metal pollution can cause adverse effect not only on growth, reproduction, survival, and metabolism in animals, but also effects the innate immune system adversely. Different concentrations of Al₂O₃ solution (10, 50 and 100 µg/mL) were injected into the proleg of the last instar *Galleria mellonella* larvae by Hamilton injector for 2, 4 and 8 hours. Then, the total hemocyte count was determined with the hemolymph obtained from the control and experimental groups. As a result of the data obtained, *G. mellonella* larvae exposed to Al₂O₃ solution showed a decrease in total hemocyte count in 2, 4 and 8 hours in all concentrations compared to the control and this reduction was found to be statistically significant. Changes in hemocyte numbers of *G. mellonella* larvae have shown that it can be used as a good model organism in evaluating environmental pollution levels and it can also lead to immunological and physiological studies on other species.

Keywords: *Galleria mellonella*, Aluminum Oxide, Total Hemocyte Count

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Kentleşme ve sanayi endüstrilerinin büyük bir hızla gelişmesi sonucu ortaya çıkan metal kirliliği çevre problemlerinden biridir. Metallerin, çevreye yayılmasının esas nedenleri doğal (volkan, erozyon) ve antropojenik faaliyetlerin (tarımsal, endüstriyel süreçler) bir sonucudur (Florea ve ark. 2004; Florea 2005; Büsselberg ve Florea 2006). Kurşun (Pb), cıva (Hg), kadmiyum (Cd), krom (Cr), arsenik (As), talyum (Tl), alüminyum (Al) gibi nispeten

yüksek yoğunlukta ve düşük miktarda pek çok toksik metal bulunmaktadır (Symon ve Hutton 1986; Hawkes 1997; Suganya ve ark. 2016; Sadhu ve ark. 2018). Alüminyum ise yer kabuğunun yaklaşık % 8' ini oluşturan önemli bir metaldir (Barabasız ve ark. 2002). Bu metale maruz kalan organizmaların kan, sinir, solunum, iskelet ve bağışıklık sistemi de dahil olmak üzere farklı biyolojik sistemlerinde toksisiteye neden olmaktadır (Willhite ve ark. 2014). Ayrıca alüminyum toksisitesi, farklı mekanizmalarla gösterilen

kan-beyin bariyer geçirgenliğinin artırılması, fosforilasyon-defosforilasyon süreçlerine müdahale edilmesi ve daha sonra serbest radikallerin üretimi ve ikincil haberci sisteminin bozulmasıyla birlikte değişen iyon metabolizmasını içermektedir (Agarwal ve ark. 1996; El-Demerdash ve ark. 2020). Alüminyumun organizmaya etkisi uygulanan derişim ve etki süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Onur 1997). Alüminyum doğada saf halde bulunmayan, organizmaya verildiğinde emilimi ve dağılımı iyi olan bir bileşendir. Günümüzde ise daha çok alüminyum tuzları olan Alüminyum hidrür (AlH_3), Alüminyum klorür ($AlCl_3$), Alüminyum oksit (Al_2O_3), Alüminyum sülfat (Al_2SO_4)₃ olarak kullanılmaktadır (Alkan ve ark. 2006). Alüminyum oksit, Al_2O_3 kimyasal formülüne sahip bir alüminyum ve oksijen bileşiginden oluşmaktadır (Pehlivan 2018). Al_2O_3 ; katalizör, yalıtım, yüzey koruyucu kaplama ve alaşım, ulaşım, kimya ve gıda sanayisi gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir (Piriyawong ve ark. 2012). Bu metaller organizmaya su, hava ve besin yoluyla alınmaktadır. Ancak fazla miktarda alınan metal bileşikler, organizmada birikerek bir tehlike oluşturduğu için ekosistemi bozmakta ve bazı organizmaların hayatı üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır (Gupta 2013; Suganya ve ark. 2016). Metallerin ekosistemdeki toksisitesini, biyolojik birikimini ve biyotransferini incelemek ve çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmek için böcekler biyoindeksör olarak kullanılan iyi bir model organizma olarak kabul edilmiştir (Banville ve ark. 2012; Wu ve Yi 2015).

Çalışmada kullanılan *Galleria mellonella* larvalarının ticari yönden üretime uygun olması, oda sıcaklığında üretiminin kolay ve kısa sürede yapılmasından dolayı son yıllarda model organizma olarak immünolojik, morfolojik ve fizyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Farklı tür organizmalarda alüminyum oksitin organizmaya alındığında hemosit sayıları üzerine toksik etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Sunulan çalışmada, *G.mellonella* larvalarına Al_2O_3 çözeltisinin farklı konsantrasyonları (10, 50 ve 100 $\mu g/mL$) enjekte edilip 2, 4 ve 8 saatlik sürelerin sonunda total hemosit sayıları üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metod

2.1. Larvaların elde edilmesi

G. mellonella, $28 \pm 2^\circ C$ sıcaklık ve $\%70 \pm 5$ bağıl neme sahip laboratuvar koşullarında Bronksil (1961) tarafından belirlenen yarı sentetik besin kültüründe yetiştirilen larvalardan elde edilmiştir. Stok kültürün devamlılığı besin kavanozu içerisine konulan ergin böceklerin çiftleşerek besin üzerine yumurta bırakmaları ile sağlanmıştır. Deneylerde bu yumurtalardan çıkan larvalar kullanılmıştır.

2.2. Al_2O_3 Çözeltisinin Hazırlanması ve Larvalara Uygulanması

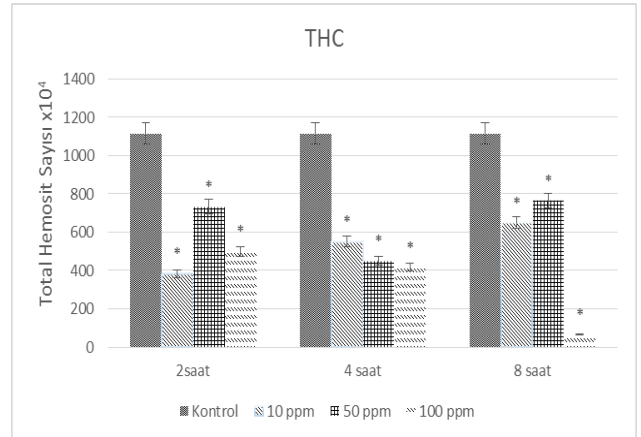
Al_2O_3 çözeltisinin derişimi 1000 mg/L olacak şekilde ultra saf su içerisinde çözülmüştür. *G. mellonella* son evre larvalarının birinci arka bacaklarına Al_2O_3 çözeltisinin 10, 50 ve 100 $\mu g/mL$ derişimleri Hamilton enjektörü yardımıyla uygulanmıştır. Kontrol grubunda ise saf su

enjekte edilmiştir. Uygulamadan 2, 4 ve 8 saatlik süreler sonunda larvalardan alınan hemolenf ile total hemosit sayıları incelenmiştir.

2.3. *G. mellonella* Larvalarının Total Hemosit Sayılarının Belirlenmesi

Hemolenf örnekleri alınmadan önce larvalar $-20^\circ C$ 'de 15-20 saniye bekletilerek hareketlerinin yavaşlaması sağlanmıştır. Larvalar $\%95$ 'lik etanol ile silindikten sonra, birinci arka bacak üstünden ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinip mikrokapiler tüp (SIGMA) yardımıyla 10 μL hemolenf alınarak içerisinde N-phenylthiourea (Sigma Aldrich) (PTU) bulunan ependorf tüplere aktarılmıştır. Alınan hemolenf örneğinden 4 μL alınarak, buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 36 μL antikoagulant (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na_2EDTA ve 0,041 M Sitrik asit, pH = 4,5) bulunan ependorf tüplerine aktarılmıştır. 1:10 oranında seyreltme yapılan hücre süspansiyonundan 10 μL alınarak Neubauer hemositometresine yüklenmiştir. Hemositler, Leica DM750 marka mikroskopta sayılarak, bir mililitre hemolenfteki hemosit sayısı belirlenmiştir. Sayılan hemositler, Jones (1962) methodu kullanılarak hesaplanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma



Şekil 1. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki total hemosit sayısı. SNK testi; “*” her uygulama grubu için istatistiksel farklılıkları belirtmek için kullanılmıştır ($p < 0.05$).

Çevre kirleticisi olarak bilinen metal ve metal bileşikler atmosfer, hidrosfer, litosfer ve biyosfer arasında hareket eden tüm ekosistemlerin doğal bileşenleridir (Bargagli 2000; Büsselberg ve Florea 2006). Metal kirliliğinin başlıca kaynağı olan volkanik patlamalar, madencilik ve sanayi endüstrileri, hidroelektrik santralleri, fosil yakıtlarının yanması ve tarım sisteminin (Pandey ve ark. 2016) oluşturduğu toksik etkiler, organizmalarda birikerek canlılar için tehlike oluşturmaktadır. Böceklerin bağışıklık sisteminde hemositler savunma mekanizmasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Wu ve ark. 2016) ve bazı organizmalarda hemosit yoğunluğu, omurgasızların doğuştan gelen immünolojik etkisinin değerlendirilmesi için bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Kacsoh ve Schlenke 2012). Yapılan çalışmada, deney süresi sonunda

tüm uygulama gruplarında mortalite gözlenmemiştir. Total hemosit sayısında 2 saatlik sürede kontrole oranla 10, 50 ve 100 µg/mL uygulanan gruplarda sırasıyla % 65, % 34 ve % 55 oranında, 4 saatlik sürede kontrole göre % 50, % 59 ve % 62 oranında, 8 saatlik etki süresinde ise % 41, % 31 ve % 94 oranında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Meydana gelen bu azalma istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 1). Çevresel koşullardaki değişikliklerden etkilenen total hemosit sayısı patojenler, parazitler ve ksenobiyotiklerinde (insektisit, ağır metal) dahil olduğu farklı tipteki stres faktörlerinden de etkilenerek değişiklik göstermektedirler (Bergin ve ark. 2003; Wu ve Yi 2015). Yapılan bir çalışmada, *G. mellonella*'nın ikinci evre larvalarına farklı derişimlerde (100, 500, 1000, 3000 ve 5000 µg/mL) ZnO NP'leri eklenmiş ve larvaların hemosit sayıları belirlenmiştir. ZnO NP'lerinin farklı derişimlerine maruz kalan grupların hemosit sayısının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Eskin ve ark. 2019). Metal toksisitesi ve beraberinde getirdiği olumsuzluklar ağır metal tipine, uygulanan hayvan türüne, maruz bırakılan doza ve hayvanın yaşamsal evresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Yılmaz 2013). *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarının besinine farklı dozlarda kadmiyum ve bakır ilave edildiğinde 12.5 mg/kg Cd konsantrasyonunda total hemosit sayısı azalırken, 50 mg/kg Cd ve Cu konsantrasyonunda önemli bir şekilde artmıştır. Böceklerin bulunduğu ortamdaki stres faktörleri altında total hemosit sayılarındaki görülen azalmanın nedeni, kan hücrelerinin dolaşımdan dokulara geçmiş olabileceğini düşündürmektedir (Sendi ve ark. 2018). Ayrıca alüminyumun da çözünebilir formu birçok metal gibi hedef organlarda daha iyi emildiği ve dağıldığı için böceklerin bağışıklık sistemine hızlı bir şekilde etki edebilir (Pastacı ve ark. 2010). Yapılan başka bir çalışmada ise *G. mellonella* besinine farklı dozlarda alüminyum klorür ($AlCl_3$) eklenmiş, böceğin larva ve pupa gelişim süresinin ve ergin ömür uzunluğunun kısaldığı ancak yaş ağırlıklarının, eşey oranlarının, morfolojisinin ve hemosit sayısının metalden etkilenmediği görülmüştür (Yılmaz 2013). Al_2O_3 çözeltisinin farklı konsantrasyon uygulamalarının, böcekler üzerinde gözlenen toksik etki mekanizmasının bilinmesi zararlı böceklerle mücadelede, hedef olmayan organizmalara ve çevreye daha az olumsuz etkisi olan yeni kimyasal metotların geliştirilmesine olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

4. Sonuçlar

Yapılan çalışmada, *G. mellonella* larvalarında Al_2O_3 çözeltisinin farklı derişimlerinin 2, 4 ve 8 saatlik etki süresine maruz bırakılarak immünolojik etkilerinin belirlenmesiyle, larvanın hemolenfinde bulunan total hemosit sayılarındaki farklılıklar tespit edilmiştir. Denenen tüm uygulama gruplarındaki total hemosit sayılarındaki azalmanın hemositler ile oluşan fagositoz, enkapsülasyon ve nodülasyon gibi immün savunma yanıtlarının metale maruz kalan böceklerin hemolenfindeki toksite düzeyine bağlı olarak meydana gelmiş olabileceği ve organizmaya alınan Al_2O_3 ile metallerin, kan hücrelerindeki proteinlere bağlanarak hemositlerin fonksiyonlarını etkilemiş olabileceği

düşülmektedir. Ayrıca çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmede *G. mellonella*'nın bir biyoindikatör olarak kullanılacağı ve başka türler üzerinde yapılacak immünolojik, fizyolojik, morfolojik ve genotoksik çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Yapılan çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FBA- 2020- 12547). Aynı zamanda bu çalışma, Gaziantep'te gerçekleştirilen 2nd International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2020) kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

- Agarwal SK, Ayyash L, Gourley CS, Levy J, Faber K, Hughes CL Jr. 1996. Evaluation of the developmental neuroendocrine and reproductive toxicology of aluminium. *Food Chem Toxicol.* 34, 49-53
- Alkan U, Teksoy A, Başkaya SH. 2006. Yüzeysel sulardaki doğal organik maddelerin gideriminde uygun koagülasyon şartlarının belirlenmesi. *Ekoloji.* 15(59), 18-26
- Banville N, Browne N, Kavanagh K. 2012. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence.* 3(6), 497-503
- Barabasz W, Albinska D, Jaskowska M, Lipiec J. 2002. Ecotoxicology of Aluminium. *Pol J Environ Stud* 11(3), 199-203
- Bargagli R. 2000. Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact. *Rev Environ Contam T.* 166: 129, 173
- Bergin D, Brennan M. & Kavanagh K. 2003. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* 5, 1389-1395
- Bronksil JF. 1961. A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *J Lepidopteran Soc.* 102-104
- Büsselberg D. and Florea AM. 2006. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals.* 19: 419-427
- El-Demerdash FM, Baghdadi HH, Ghanem NF, Al Mhanna AB. 2020. Nephroprotective role of bromelain against oxidative injury induced by aluminium in rats. *Environ Toxicol Phar.* 80, 103509
- Eskin A, Öztürk Ş, and Körükçü M. 2019. Determination of the acute toxic effects of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) in total hemocytes counts of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) with two different methods. *Ecotoxicology.* 28:801-808
- Florea AM, Dopp E, Obe G, Rettenmeier AW. 2004. Genotoxicity of organometallic species. In: Hirner AV, Emons H, eds. *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment: Analysis, Distribution, Processes and Toxicological Evaluation.* Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 205-219
- Florea AM. 2005. Toxicity of Alkylated Derivatives of Arsenic, Antimony and Tin: Cellular Uptake, Cytotoxicity, Genotoxic Effects, Perturbation of Ca^{2+} Homeostasis and Cell Death. Aachen: Shaker Verlag
- Gupta V. 2013. Mammalian Feces as Bio-Indicator of Heavy Metal Contamination in Bikaner Zoological Garden, Rajasthan, India. *Res J Anim Vet Fish Sci.* 1(5), 10-15
- Hawkes JS. 1997. Heavy metals. *J Chem Educ.* 74 (11) : 1374

- Jones JC. 1962. Current Concepts Concerning Insect Hemocytes. *Am Zool.* 2:209-246
- Kacsóh BZ, Schlenke TA. 2012. High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. *Plos One.* doi.org/10.1371/journal.pone.0034721
- Onur E. 1997. Alüminyum Toksikitesinin Kalite Kontrol Açısından Değerlendirilmesi. *Turk Neph Dial Transpl.* 6, 164-170.
- Pandey R, Dwivedi MK, Singh PK, Patel B, Pandey S, Patel B, Patel A. & Singh B. 2016. Effluences of heavy metals, way of exposure and bio-toxic impacts: an update. *J Chem & Chem Sci.* 6(5), 458-475
- Pastacı N, Bahtiyar N, Karabük S, Gönül R, Or EM, Dursun Ş, Barutçu BÜ. 2010. Köpeklerde Alüminyum toksikasyonunun Alzheimer hastalığı üzerine Etkisi. *Tübav.* 3(3), 271-275
- Pehlivan M. 2018. Alüminyum oksit nanopartiküllerin ve demir bazlı manyetik alüminyum oksit nanokompozitlerin çözelti yakma metodu ile sentezi ve uygulamaları. İstanbul, Türkiye.
- Piriyawong V, Thongpool V, Asanithi P, Limsuwan P. 2012. Preparation and Characterization of Alumina Nanoparticles in Deionized Water Using Laser Ablation Technique. *J Nanomater.* 1-6
- Sadhu SD, Garg M, Kumar A. 2018. Major Environmental Issues and New Materials. *New Polymer Nanocomposites for Environmental Remediation.* s. 77- 97
- Sendi JJ, Baghban A, Zibae A. 2018. Effect of essential and non-essential elements on cellular immune system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *ISJ,* 15: 158-168
- Suganya M, Karthi S, and Shivakumar MS. 2016. Effect of Cd and Lead Exposure on Tissue Specific Antioxidant Response in *Spodoptera litura*. *Free Rad. Antiox.* Vol.6: 90-100
- Symon C, Hutton M. 1986. The quantities of cadmium, lead, mercury and arsenic entering the U.K. environment from human activities. *Sci Total Environ.* 57: 129-150
- Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, Yenugadhati N, Wisniewski TM, Arnold IM, Momoli F, Krewski D. 2014. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit Rev Toxicol.* 44, 1-80
- Wu G, Yi Y. 2015. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comp Biochem Phys C.* 167:131- 139
- Wu G, Liu Y, Ding Y, Yi Y. 2016. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue and Cell.* 48, 297-304
- Yılmaz, E. 2013. Farklı dozlardaki Alüminyum Klorür'ün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Biyolojisine ve Hemositlerine etkisi. İstanbul, Türkiye.