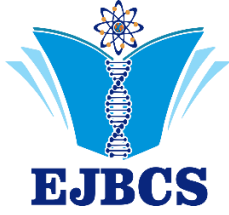


RESEARCH ARTICLE

Eurasian J Bio Chem Sci, 3(Ek 1):213-216, 2020
https://doi.org/10.46239/ejbcsc.820730




Eurasian Journal of
Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.org.tr/ejbcsc



Çinko oksit nanopartikülünün *Galleria mellonella* (Lepidoptera:Pyralidae) (L.) larvalarında asetilkolinesteraz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Yağmur Meşe¹ , Benay Tunçsoy² , Pınar Özalp^{3*} 

^{1,3*}Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji, Adana
²Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomühendislik, Adana

*Sorumlu Yazar: pozalp@cu.edu.tr

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

Received : 04/11/2020

Accepted : 25/12/2020

Özet: Çinko oksit nanopartikülü (ZnO NP), nanoteknolojinin gelişmesiyle birçok alanda (gıda ve ambalaj katkı maddeleri sanayii, kozmetik, güneş kremleri v.b.) yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik membranlardan rahatlıkla geçebilen nanopartiküller organ, doku, hücre ve moleküler düzeyde olumsuz etkilere ve birikime neden olabilmektedirler. Yapılan çalışmada, *Galleria mellonella* son evre larvalarına arka bacaklarından ZnO NP enjeksiyon yoluyla 30 mg/l ve 30 µg/mL derişimlerinde uygulanmıştır. Uygulama sonunda kontrol ve deneme gruplarından izole edilen yağ dokudaki oksidatif stres düzeyi AChE enzim aktivitesinin tespiti ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, ZnO NP maruz kalan *G. mellonella* larvalarının yağ dokudaki AChE aktivitesinde kontrole göre her iki uygulama grubunda da istatistiki olarak belirgin artış ve azalışlar göstermiştir. Toksikite çalışmaları için basit, ucuz ve hızlı üretilebilen bir model olan *G. mellonella* larvalarının yağ dokusundaki makromoleküllerin olası değişikliklerinin tespit edilmesi ile biyokimyasal etkilerin anlaşılması, çevreye daha az olumsuz etkisi olan yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacağı ve elde edilen veriler doğrultusunda yapılacak immünolojik ve fizyolojik çalışmalara yol gösterebileceği düşünülmektedir

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*, Asetilkolinesteraz, Çinko oksit, Nanopartikül

Effects of zinc oxide nanoparticle on acetylcholinesterase enzyme activity in Galleria mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae

Abstract: Zinc oxide nanoparticles (ZnO NP) is widely used in many field, food and packaging additives industry, cosmetics, sunscreens etc., with the development of nanotechnology. Nanoparticles can readily pass through biological membranes and so cause negative effects and accumulation at the organ, tissue, cell and molecular level. In this study, 30 mg/l and 30 µg/mL concentrations of ZnO NP were injected into the first proleg of the last instar *Galleria mellonella* larvae. Then, the antioxidant stress level in fat body isolated from the control and application groups was determined by determining the AChE enzyme activity. As a result of the data obtained, AChE activity in fat body of *G. mellonella* larvae exposed to ZnO NP showed statistically significant increases and decreases in both groups compared to control. It have shown that, understanding the biochemical effects and determine to the possible changes of macromolecules in fat body of *G.mellonella* larvae, which is a simple, inexpensive and fast to produce model for toxicity studies, will help develop methods that have less adverse effects on the environment and lead to immunological and physiological studies.

Keywords: *Galleria mellonella*, Acetylcholinesterase, Zinc oxide, Nanoparticle

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Nanoteknolojinin hızlı gelişim göstermesi sonucu çeşitli boyut ve çaplardaki nanomateryaller ticari ve endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Nanomateryaller, yüzey alanlarının geniş olması ve yüksek reaksiyon

aktiviteleri ile son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Nanopartiküller yüksek yüzey-hacim oranı, elektronik yapı, yüksek reaksiyon aktiviteleri gibi belirgin derecede farklı fizikokimyasal özelliklere ve boyutlara sahip 100 nm'den küçük bileşiklerdir. (Portakal 2008). Metal oksit nanopartikülleri, cam ve boya sanayinde, cilalamada,

elektronik eşya üretiminde, ilaç ve gıda katkı maddelerinde, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde, biyoteknoloji ve tıp alanında görüntüleme sıklıkla kullanılmaktadır. Çinko oksit nanopartikülü (ZnO NP) boya, diş macunu, güneş kremleri, pillerde, antibakteriyel, gıda sanayisi ve ambalaj paketlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Jun ve ark. 2013; Kim ve ark. 2017; Du ve ark. 2018; Keerthana ve Kumar 2020). Nanomateriyallerin birçok alanda kullanılması ve uygulanması, çevre ile etkileşiminin büyük ölçüde artmasına yol açmaktadır. Biyolojik membranlardan rahatlıkla geçebilen nanopartiküller organ, doku, hücre ve moleküler düzeyde olumsuz etkilere ve birikime neden olabilmektedir. Eser element olarak çinko (Zn) canlılığın devamı, çoğalması ve immün sistemin faaliyetlerinin sürdürülmesi için gereklidir. Zn metalloenzim ve proteinlerin kofaktörü ve birçok DNA-bağlayıcı proteinin çinko basamaklarında çok çeşitli enzimlerde aktif bölgeler oluşturan kritik bir elementtir (Dow 2017). Ayrıca immün sistem hücreleri ile önemli bileşimler arasında ara bulucu rol oynamaktadır (Weiss ve Carver 2018). Aynı zamanda belirli konsantrasyonlarda serbest radikal oluşumunu indükleyerek oksidatif strese neden olabilmektedir. Zhao ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada ZnO NP' nin *Danio rerio* embriyolarında oksidatif stres ve DNA hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Oksidatif stres; reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ve bozulması arasındaki dengesizliğe dayanan fizyolojik ya da patofizyolojik süreç olarak tanımlanmaktadır (Staerck ve ark. 2017). ROT hücreler makro moleküllere saldırarak proteinlerin oksidasyonuna, nükleik asitlerin zarar görmesine, lipid peroksidasyonuna ve hücre savunma sistemlerinin aktive olmasına neden olmaktadır (Hermes-Lima ve Zenteno-Savin 2002; Gavrilovic ve ark. 2017). Detoksifikasyon enzimleri genellikle ksenobiyotiklere karşı enzimatik savunma olarak gösterilmektedir ve normal fizyolojik fonksiyonlarının devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Tunçsoy 2018). Asetilkolinesteraz (AChE), Sitokrom P450 (CytP450) ve glutatyon-s-transferaz (GST) organizmalarda ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumlu enzimlerdir. Bu gibi enzimlerin artışları ksenobiyotiklerin ve/veya kontaminantların toksik etkisinin belirlenmesinde biyomarkır olarak kullanılmaktadır. AChE, hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda, başta sinir ve kas dokusunda olmak üzere merkezi ve periferel birçok dokuda yaygın olarak bulunan nöronal bir enzimdir. (Tunçsoy 2017). AChE'nin ana işlevi, nörotransmitter asetilkolini (ACh) hidroliz ederek nörotransmisyonu düzenlemektir (Kim 2017). ACh sinir uçlarından etkilendiği organa veya sinir ucundan ikinci bir sinir hücresine, sinir implusu taşıma görevini yapmaktadır. Sinapsislerdeki artan ACh konsantrasyonu ve daha fazla uyarılmış merkezi sinir sistemi böceklerde ülüme yol açmaktadır (Yorulmaz 2009). Yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlarda uygulanan ZnO NP'nin *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Toksikite çalışmaları için basit, ucuz ve hızlı üretilebilen bir model olan *G. mellonella* larvalarının yağ dokusundaki

makromoleküllerin olası değişikliklerinin tespit edilmesi ile biyokimyasal etkilerin anlaşılması, çevreye daha az olumsuz etkisi olan yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacağı ve elde edilen veriler doğrultusunda yapılacak immünolojik ve fizyolojik çalışmalara yol gösterebileceği düşünülmektedir.

2. Materyal ve Metod

G. mellonella L. larvaları, laboratuvar ortamında kitle üretimi yapılan $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve $\%70 \pm 5$ bağıl neme sahip ortam koşullarında Bronksill (1961) tarafından belirlenmiş olan yarı sentetik besin ile beslenen stok kültüründen elde edilmiştir. *G. mellonella* son evre larvalarına arka bacaklarından ZnO NP enjeksiyon yoluyla $30 \mu\text{g/L}$ ve 30 mg/L derişimlerinde uygulanmıştır. Uygulama sonunda larvalar sırt kısmı strafora gelecek şekilde sabitlenerek birinci çift arka bacaklarının önünden orta eksen boyunca alkol ile dezenfekte edilmiş mikro makas ile kesilerek larvaların yağ dokusu alınmıştır. Daha sonra eppendorf tüplere alınan yağ doku örneklerinin üzerine 1:5 oranında Tris HCl (100 mM, pH: 8.0) çözeltisi eklenmiştir. Tris HCl solüsyonun miktarının 10 katı hacminde $\%10$ Triton karışıma ilave edilmiştir. Örnekler 2 dk. homojenize edilmiş ve toplam homojenat $12000 \text{ g}'$ de $+4^\circ\text{C}'$ de 30 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen supernatantın bir kısmı total protein tayini için, kalan kısmı ise AChE aktivitesinin belirlenmesi için $-80^\circ\text{C}'$ de derin dondurucuda saklanmıştır. AChE aktivitesi Ellman ve ark. (1961), total protein tayini ise Bradford (1976) tarafından belirlenen metoda göre analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler kontrol ve deney grupları arasındaki istatistiksel veriler SPSS 21.0 bilgisayar programında SNK testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

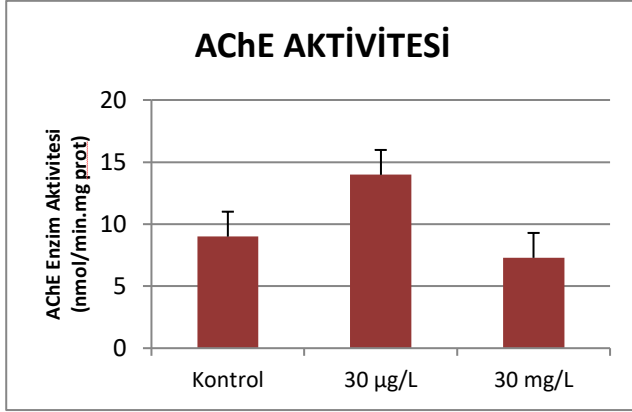
3. Bulgular

Tablo 1'de *G. mellonella* larvalarının kontrol ve ZnO NP ($30 \mu\text{g/L}$, 30 mg/L) uygulamasının yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi gösterilmiştir. *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesinde kontrole göre her iki uygulama grubunda da istatistiki olarak farklılıklar görülmüştür. (Şekil 1)

Tablo 1: Farklı derişimlerdeki ZnO NP'nin *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi üzerine etkileri

DERİŞİM	AChE AKTİVİTESİ (U/dk/mg protein)
Kontrol	8,993±0,158 a
30 µg/L	13,970±0,254b
30 mg/L	7,281±0,034 c

*SNK; Küçük harfler uygulama ve kontrol arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur ($P < 0.05$).



Şekil 1: Farklı derişimlerdeki ZnO NP'nin *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

4. Tartışma

ACh sinir uçlarından etkilendiği organa veya sinir ucundan ikinci bir sinir hücreğine, sinir implusu taşıma görevini yapmaktadır. AChE'nin ana işlevi, nörotransmitter ACh'yi hidroliz ederek nörotransmisyonu düzenlemektir (Kim 2017). *Apis mellifera* ile yapılan çalışmada ZnO NP'nin böceğin AChE enzim aktivitesinde önemli derecede artışa, beyin ve protein içeriğinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Milivojevi ve ark. 2015). *Spodoptera littoralis* ile yapılan bir çalışmada ZnO NP'nin enzim aktivitelerinde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir (Ibrahim ve Ali 2018). *Schistocerca gregaria* nimfleri ile yapılan bir çalışmada abamectin uygulaması sonucunda AChE aktivitesinde artış meydana gelirken, *Spodoptera litura* larvalarındaki enzim aktivitesinde önemli bir değişim olmadığı bildirilmiştir (Abd El-Aziz 2010, 2015).

Yapılan bu çalışmada 30 µg/L grubunda AChE aktivitesi kontrole göre %62,5 oranında belirgin bir artış göstermiştir (Şekil 1). *G. mellonella* ile yapılan başka bir çalışmada sodyum tetraboratın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda, hemolenfte AChE aktivitesinde azalma meydana geldiği, yağ dokuda ise artış olduğu tespit edilmiştir (Durmuş 2007). Oksidatif stresin yani serbest radikallerin artması ile ACh salınımında bir artış olmuş ve bu nedenle de AChE aktivitesinin artmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin etkileri, konsantrasyona, dokuya ve süreye bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

Böceklerin toksik maddeler ile reaksiyonları hızlı ve güçlüdür. Yapılan çalışmalarda toksik metallerin bu tür böcekler üzerindeki büyüme inhibisyonu, gelişim bozuklukları, mortalitesi, fizyolojilerinin yeniden düzenlenmesi, biyokimyası vb. akut ve kronik etkiler sıklıkla bildirilmektedir (Peric-Mataruga ve ark. 2019). Metallerin dokuda birikmesi, yüksek süperoksit radikallerinin veya hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi türevlerin oluşumunu artırır (Gopi ve ark. 2019). Yapılan çalışmalarda ZnO NP'nin dokularda biriktiği ve apoptozise neden olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda 30 mg/L derişiminde uygulanan grupta kontrole göre %12,5 oranında bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 1). ZnO NP'nin toksisitesi sonucunda serbest radikallerin artması ve artan

radikallerin AChE aktivitesini azaltmasıyla enzim aktivitesi inhibe olmuş olabilir. Başka bir yorum artan serbest radikallerin, enzimlerin kofaktörü olan Zn iyonları ya da enzim yapısındaki aminoasitler ile etkileşerek enzimlerin aktivitesini azaltmış olabilir. Sinapsislerdeki AChE organizmalarda ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumlu enzimlerden biridir. Ksenobiyotikler AChE'ye bağlanır, ACh hidroliz edilmesine rağmen ksenobiyotikler enzim-substrat kompleksi olarak sabit kalır ve AChE enzimi bloke edilerek ACh resöptörlerinin uyuşması sağlanır. Detoksifikasyon enzimleri genellikle ksenobiyotiklere karşı enzimatik savunma olarak gösterilmekte ve normal fizyolojik fonksiyonların devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Tunçsoy 2018). Bu gibi enzimlerin artışları ve/veya azalışları ksenobiyotiklerin toksik etkisinin belirlenmesinde biyomarkör olarak kullanılmaktadır.

5. Sonuç

Yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlardaki ZnO NP'nin in vitro koşullarda biyoindikatör bir tür olan *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak organizmaya farklı konsantrasyonlarda uygulanan ZnO nanopartiküllerinin, canlıda oksidatif strese neden olduğu ve AChE enzim aktivitesini etkilediği görülmüştür. Dünya nüfusunun büyük bir kısmını oluşturan böcekler doğada çok yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Nanopartiküllere hava, su, oral yollarla maruz kalabilen böcekler, çevre kirliliği düzeylerinin belirlenmesinde biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yaşam döngülerinin kısa olması ve hızlı üremelerinden dolayı laboratuvar ortamında kolay üretilmektedirler. Bu özelliklerinden dolayı da insan akut toksisite, bakteriyel ve fungal patojenite, antimikrobiyal farmakinetik etkilerinin araştırılması çalışmalarında omurgalılara alternatif olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Omurgalılara benzer immün sistem tepkileri gösteren model organizma ve biyoindikatör bir tür olan *G. mellonella*'nın, böcek fizyolojisinde önemli bir parametre olan detoksifikasyon sistemlerinin ZnO NP'ye verdiği tepkilerin anlaşılması ileride yapılacak toksikolojik, genotoksik, fizyolojik ve ekotoksikolojik çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

Yapılan çalışma, Ç.Ü. 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

Bradford M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-54

- Bronksill JF. 1961. A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria Mellonella* (Pyralidae). J Lep Soc. 102-4
- Dow JAT. 2017. The Essential Roles of Metal Ions in Insect Homeostasis and Physiology. *Curr Opin Insect Sci.* 23:43-50
- Du J, Tang J, Xu S, Ge J, Dong Y, Li H, Jin M. 2018. ZnO nanoparticles: recent advances in ecotoxicity and risk assessment. *Drug Chem Toxicol.* doi:10.1080/01480545.2018.1508218
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol.* 7:88-95
- Gavrilović A. 2017. Effects of Benzo[a]Pyrene Dietary Intake to Antioxidative Enzymes of *Lymantria Dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Larvae from Unpolluted and Polluted Forests. *Chemosphere.* 179: 10-19
- Gopi N, Vijayakumara S, Thaya R, Govindarajan M, Alharbi N, Kadaikunnan S, Khaled J, Al-Anbr M, Vaseeharan B. 2019. Chronic exposure of *Oreochromis niloticus* to sub-lethal copper concentrations: Effects on growth, antioxidant, non-enzymatic antioxidant, oxidative stress and non-specific immune Responses. *J Trace Elem Med Bio* 55:170-179
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T. 2002. Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 133(4): 537-556
- Ibrahim AMA, Ali MA. 2018. Silver and Zinc Oxide Nanoparticles Induce Developmental and Physiological Changes in the Larval and Pupal Stages of *Spodoptera Littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Asia-Pac Entomol.* 21(4): 1373-1378
- Jun X, Zhou ZH, Hua LG. 2013. Effects of Selected Metal Oxide Nanoparticles on Multiple Biomarkers in *Carassius auratus*. *Biomed Environ Sci.* 26(9): 742-749
- Keerthana S, Kumar A. 2020. Potential risks and benefits of zinc oxide nanoparticles: a systematic review. doi:10.1080/10408444.2020.1726282
- Kyu-Bong K, Kim YW, Lim SK, Roh TH, Bang DY, Choi SM, Lim Y, Kim YJ, Baek S-H, Kim M-K, Seo H-S, Kim M-H, Kim HS, Lee JY, Kacew S, Lee B-M. 2017. Risk assessment of zinc oxide, a cosmetic ingredient used as a UV filter of sunscreens. *Jpn J Tox Env Health.* 20(3):155-182
- Milivojević T, Glavan G, Božić J, Šepčić K, Mesarić T, Drobne D. 2015. Neurotoxic potential of ingested ZnO nanomaterials on bees. *Chemosphere.* 120:547-554
- Perić-Mataruga V. 2019. Parameters of Oxidative Stress, Cholinesterase Activity, Cd Bioaccumulation in the Brain and Midgut of *Lymantria Dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Caterpillars from Unpolluted and Polluted Forests. *Chemosphere.* 218: 416-24.
- Portakal O. 2008. Bioassays and Nanoparticles. *Turk J Biochem.* 33 (1):35-38
- Tunçsoy B. 2017. Pyriproxyfen ve *Bacillus thuringiensis* 'in *Galleria mellonella* L.' nin Oksidatif stres Düzeyi, Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemi ve Hemosit Sayılarına Etkileri. Adana, Türkiye.
- Tunçsoy B, Tunçsoy M, Gomes T, Sousa V, Teixeira RM, Bebianno MJ, Ozalp P. 2018. Effects of Copper Oxide Nanoparticles on Tissue Accumulation and Antioxidant Enzymes of *Galleria mellonella* L.. *B Environ Contam. Tox.* doi:10.1007/s00128-018-2529-8
- Weiss G, Carver PL. 2018. Role of Divalent Metals in Infectious Disease Susceptibility and Outcome. *Clin Microbiol Infect.* 24(1): 16-23