



## Cu, Zn ve Karışımlarının *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Hemosit Tipleri ve Sayıları Üzerine Etkileri

Ayşe KARA<sup>1</sup> Benay TUNÇSOY<sup>2</sup> Pınar ÖZALP<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

<sup>2</sup>Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Adana, Türkiye

Geliş/Received: 21.11.2019

Kabul/Accepted: 21.02.2020

Atf yapmak için: Kara, A., Tunçsoy, B. & Özalp P. (2020). Cu, Zn ve Karışımlarının *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Hemosit Tipleri ve Sayıları Üzerine Etkileri. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 45-51.

How to cite: Kara, A., Tunçsoy, B. & Özalp P. (2020). Effects of Cu, Zn and its mixtures on Hemocyte Types and Counts of *Galleria mellonella* L. Larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 45-51.

<https://orcid.org/0000-0002-5641-9738>

<https://orcid.org/0000-0003-4361-3475>

<https://orcid.org/0000-0002-2977-6334>

\*Sorumlu yazarın:

Pınar ÖZALP

Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Bölümü,

Adana, Türkiye

✉: [pozalp@cu.edu.tr](mailto:pozalp@cu.edu.tr)

Cep telephone : +90 (532) 733 98 62

**Öz:** Yapılan çalışmada, Zn (30 mg/L) ve Cu (10 mg/L)' nun tek başına ve karışım halinde toksik etkilerinin *Galleria mellonella* larvalarının hemosit tipleri ile total ve diferansiyel hemosit sayıları üzerine etkileri incelenmiştir. *G.mellonella* larvalarında prohemosit, granülosit, plazmatosit, sferülosit ve önositoid olmak üzere beş tip hemosit gözlenmiştir. 72 saatlik etki süresinde Zn ve Cu' in tek başına ve karışım halindeki uygulamalarında total hemosit sayısında (THS) azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Prohemosit, granülosit, sferülosit ve önositoid sayılarında ise azalma meydana gelmiş, plazmatosit sayılarında ise artış tespit edilmiştir. *G.mellonella* larvalarının hemosit sayılarında meydana gelen değişimler çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmede iyi bir model organizma olarak kullanılabilirliğini ve başka türler üzerinde de yapılacak immünolojik çalışmalara yol gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Bakır, Çinko, *Galleria mellonella*, hemositler.

## Effects of Cu, Zn and its mixtures on Hemocyte Types and Counts of *Galleria mellonella* L. Larvae (Lepidoptera: Pyralidae)

\*Corresponding author's:

Pınar ÖZALP

Cukurova University, Department of Biology,

Adana, TURKEY.

✉: [pozalp@cu.edu.tr](mailto:pozalp@cu.edu.tr)

Mobile telephone : +90 (532) 733 98 62

**Abstract:** Toxic effects of Zn (30 mg / L) and Cu (10mg / L) applied singly and in mixture were investigated on the total and differential hemocyte counts of *Galleria mellonella* larvae.

Five types of hemocytes were observed in *G. mellonella* larvae; prohemocytes, granulocytes, plasmatocytes, spherulocytes and eunocytoids. Total hemocyte count (THC) decreased when larvae exposed to Zn and Cu concentrations singly and in mixture for 72 hours. Prohemocytes, granulocytes, spherulocytes and eunocytoid numbers were decreased whereas plasmatocyte numbers were increased. Changes in the 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 studies on other species.

**Keywords:** Copper, Zinc, *Galleria mellonella*, Hemocytes.

## GİRİŞ

Çevre kirliliği dünyanın bugüne kadar karşı karşıya kaldığı ciddi problemlerden biridir. Ağır metaller doğada düşük derişimlerde bulunmakla beraber, hızlı nüfus artışı ve buna bağlı olarak artan sanayileşme doğada ağır metal derişiminin artmasına neden olmakta ve çevre kirliliğinin önemli etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Chouhan vd., 2017; Tunçsoy, 2019). Metal kirliliğinin başlıca kaynağı olan volkanik patlamalar, madencilik ve sanayi endüstrileri, fosil yakıtlarının yanması, hidroelektrik santralleri ve tarım sisteminin oluşturduğu toksik etkiler, organizmalarda birikerek canlılar için bir tehlike oluşturmaktadır (Pandey vd., 2016). Çevre kirleticisi olarak bilinen metal ve metal bileşikler atmosfer, hidrosfer, litosfer ve biyosfer arasında hareket eden tüm ekosistemlerin doğal bileşenleridir (Bargagli, 2000; Büsselberg & Florea, 2006).

Ağır metaller organizmaya besin, su ve hava yoluyla alınabilir, fakat aşırı miktarda alınan metaller organizmada birikerek ekosistemi bozmakta ve çoğu organizmanın yaşamı üzerinde toksik etkiler meydana getirmektedir (Gupta, 2013; Suganya vd., 2016). Ağır metal kirliliği sadece hayvanlarda büyüme, üreme, hayatta kalma ve metabolizma ile değil, aynı zamanda doğuştan gelen bağışıklık sisteminde de zararlı etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle böcekler gibi omurgasız hayvanlar, ağır metal toksisitesini incelemek ve çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmek için iyi bir model organizma olarak kabul edilmekte (Wu & Yi, 2015), çevre kontaminasyonunda da yararlı biyoindikatörler olarak kullanılmaktadır (Borowska & Pyza, 2011).

Edinilmiş bir bağışıklık sisteminden yoksun olan böcekler, enfeksiyon ajanlara karşı hızlı ve etkili yanıtlar sağlayarak doğuştan gelen bağışıklık sistemlerine sahiptir. Bu bağışıklık sistemleri humoral ve hücrel yanıtlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Rosales, 2011). Humoral savunma yanıtı antimikrobiyal peptidler (AMPs), hemolenf melanizasyonu ve pıhtılaşması, reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerin üretimini içermektedir (Nappi & Ottaviani, 2000; Cerenius & Soderhall, 2004; Kanost vd., 2004; Mastore vd., 2015; Shen vd., 2016). Hücrel savunma yanıtı çeşitli hemosit türleri ile aracılık ettiği fagositoz, nodülasyon ve enkapsülasyonla ilgilidir (Lavine & Strand, 2002; Negri vd., 2014; Wu vd., 2016). Lepidoptera takımı ile yapılan çalışmalarda hemositler prohemositler, plazmatositler, granülositler, sferülositler ve önositoidlerden oluşmaktadır (Ribeiro & Brehelin, 2006; Strand, 2008; Wu vd., 2016).

Prohemositler, hemosit tiplerinden bir veya daha fazlasına farklılaşabilen kök hücreler olarak bilinmektedir (Lavine & Strand, 2002). Plazmatositler, yabancı yüzeylere yapışabilme özelliğine sahiptir ve yara iyileşmesi, nodül oluşumu, fagositoz ve kapsülleme gibi bağışıklık yanıtlarında önemli bir rol oynarlar (Chapman, 1998, Lavine

& Strand, 2002; Levin, 2007). Granülositler, membrana bağlı granüller tarafından morfolojik olarak ayırt edilirler ve yabancı yüzeylere yapışma ve yayılma özelliği ile fagosit olarak da işlev görmektedir (Strand vd., 2006). Sferülositlerin en belirleyici özelliği sitoplazmik boşlukta membrana bağımlı sferül (küresel) şekillerinin olmasıdır (Levin, 2007). Önositoidler, fenoloksidaz (PO) enziminin ana bileşenlerini içeren yapışkan olmayan hücrelerdir (Lavine & Strand, 2002; Vogelweith vd., 2016).

Çalışmada kullanılan *Galleria mellonella* L. (Büyük balmumu güvesi) Pyralidae familyası, Lepidoptera takımına ait holometabol bir böcektir. Bu tür, hava sıcaklığına uygun bölgelerde yaşayan, hızlı bir üreme döngüsüne sahip ve arıcılık sektörünü de ekonomik sıkıntılara neden olan zararlı bir tür olarak bilinmektedir.

Farklı tür organizmalarda ağır metallerin ve karışımlarının organizmaya alındığında kan hücreleri üzerine toksik etkileri ile ilgili çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Sunulan çalışmada, bakır (Cu) ve çinko (Zn)' nun tek başına ve karışım halinde farklı derişimlerinin *G.mellonella* larvalarının hemosit tipleri ve sayıları üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Larvaların elde edilmesi:** *G. mellonella*,  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklık ve %70±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.

**Ağır Metal Derişimlerinin Hazırlanması ve Larvalara Uygulanması:** Cu (10 mg/L), Zn (30 mg/L) ve Cu+Zn (10 mg/L+ 30 mg/L) karışımı ile hazırlanan metal derişimleri, deneyde kullanılan peteklere daldırma metodu ile uygulanmıştır. Hazırlanan her bir besin grubuna beşinci evredeki larvalardan 20 adet eklenmiş, kontrol ve uygulama grupları 72 saatlik deney süresi tamamlanana kadar gün aşırı kontrol edilmiştir. Cu, Zn ve Cu+Zn karışımı ile uygulanmış peteklerle beslenen beşinci evre *G. mellonella* larvaları 72 saat sonunda besin ortamından alınmıştır.

***G. mellonella* Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi:** Hemolenf elde edebilmek için uygulamadan 72 saat sonra besin ortamından alınan larvalar  $-20^\circ\text{C}$ 'de 3 dakika 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 5 µl hemolenf elde edilmiştir. Hemolenf melanizasyona izin vermeden hızlı bir şekilde daha önce alkolle temizlenmiş lamlar üzerine

alınarak yayılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Lamların kurumasını takiben hemositlerin fiksasyonu için lamlar 5 dakika süre ile metanol: asetik asit (3:1) çözeltisi içinde bekletildi ve çözelti üzerlerinden akıtılarak kurumaya bırakıldı. Hemositlerin boyanabilmesi için taze olarak hazırlanan Giemsa boya çözeltisi kullanılmıştır. Boyama çözeltisinin hazırlanabilmesi için, 3 ml giemsa boya solüsyonu (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution), içerisinde 57 ml PBS (pH 7.4) bulunan lam boyama kaplarına yavaşça damlatılarak karıştırılmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Tespit işleminden sonra kurutulan lamlar giemsa boya çözeltisi içine alınarak 15 dakika süresince boyanmaları sağlanmıştır. Boyanma süresi sonunda lamlar saf su ile yıkandı, en son PBS (Fosfat buffer saline, Sigma) 'den geçirilmiştir. Kuruma işleminden sonra ksilolden geçirilerek tekrar kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, entellan ile kapatılarak Leica DM750 marka mikroskopta hemosit tipleri belirlenerek sayım işlemi yapılmıştır. Total hemosit sayısının belirlenmesinde ise, 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<sub>2</sub>EDTA 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.

**Verilerin Analizi:** Verilerin istatistiksel analizi SPSS 21.0 bilgisayar programında SNK (Student Newman Keul's) testi kullanılarak yapılmıştır. Ortalamalar arası fark 0.05 olasılık seviyesinde F değerinden büyük olduğu zaman önemli kabul edilmiştir ( $p<0.05$ ).

## BULGULAR

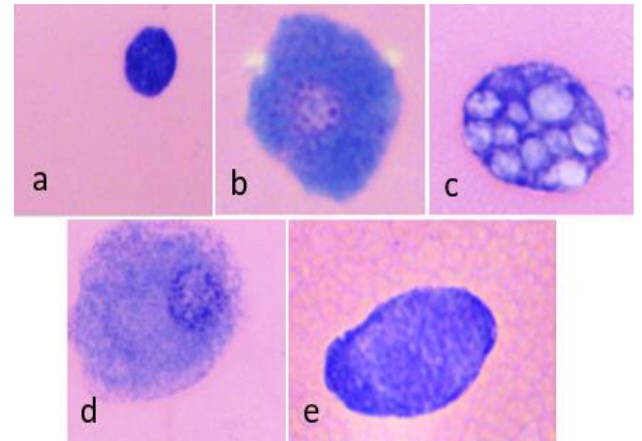
**Hemosit tiplerinin belirlenmesi:** *G. mellonella* larvalarında prohemosit, granülosit, plazmatosit, sferülosit ve önositoid olmak üzere beş tip hemosit gözlenmiştir (Şekil 1).

**Total Hemosit Sayısı:** Total hemosit sayısı, Cu ve Cu+Zn karışımı uygulama grupları ile Zn ve Cu+Zn karışımı uygulama gruplarında kontrole oranla bir azalma göstermiş ve bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Tablo 1).

**Diferansiyel Hemosit Sayısı:** Plazmatosit sayısı, Cu ve Cu+Zn karışımı uygulama grupları ile Zn ve Cu+Zn karışımı uygulama gruplarında kontrole oranla bir artış meydana gelmiş ve bu artış istatistiksel açıdan önemli kabul edilmiştir ( $p<0.05$ ). 72 saatlik uygulama sonrası larvaların

hemolenfide en fazla bulunan hemosit tipinin plazmatosit olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2).

Prohemosit sayısı, Cu ve Cu+Zn karışımı besin gruplarında kontrol grubuna oranla önemli bir azalma gözlenmiştir. Zn içeren besin grubu, Cu+Zn karışımı gruba oranla önemli bir artış göstermiş fakat istatistiksel açıdan önemli kabul edilmemiştir. Granülosit sayısı, Cu ve Cu+ Zn karışımı uygulama grupları ile Zn ve Cu + Zn karışımı uygulama gruplarında kontrole oranla önemli bir azalma göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ( $p<0.05$ ) (Tablo 2). Sferülosit sayısı, Cu ve Cu+ Zn karışımı uygulama grupları ile Zn ve Cu + Zn karışımı uygulama gruplarında kontrole oranla bir azalma göstermiş ve önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Tablo 2). Önositoid sayısı, Zn ve karışım uygulama grubu (Cu+Zn) ile Cu ve karışım uygulama grupları (Cu+Zn) kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Yapılan çalışmada larvaların hemolenfide en az bulunan hemosit tipinin önositoid olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 1.** *G. mellonella* larvalarındaki hemosit tipleri; a. Prohemosit, b. Granülosit, c.Sferülosit, d. Önositoid, e. Plazmatosit (Ölçü Barı: 10 µm; X100).

**Figure 1.** Hemocyte types in *G. mellonella* larvae; a. Prohemocyte, b. Granulocyte, c.Spherulocyte, d. Eucyctoid, e. Plasmacyte (Size Bar: 10 µm; X100).

**Tablo 1.** *G. mellonella* larvalarının hemolenfide Cu, Zn ve karışımlarının total hemosit sayısı üzerine etkileri (Ortalama ±Standart Hata).

**Table 1.** Effects of Cu, Zn and mixtures on total hemocyte count in hemolymph of *G. mellonella* larvae (Mean ± Standard Error).

Ağır metal (mg/L)	Total Hemosit Sayısı (Ort ± SH)*
Kontrol	176.6 ± 44.09 a
Cu(10 mg/L)	160.0 ± 57.73 b
Zn (30 mg/L)	725.0 ± 14.43 c
Cu +Zn (10:30 mg/L)	120.0 ± 28.86 d

\*SNK; Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiksel fark bulunmaktadır ( $p<0.05$ ). SNK; Lowercase letters are used to show the difference between heavy metals. There is a statistical difference between the data shown in different letters ( $p<0.05$ ).

**Tablo 2.** *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde Cu, Zn ve karışımlarının Plazmatosit, prohemosit, granülosit, sferülosit ve önositoid sayıları üzerine etkileri (Ortalama ±Standart Hata).

**Table 2.** Effects of Cu, Zn and its mixtures on plasmacyte, prohemocyte, granulocyte, spherulocyte and eunocytoid counts in hemolymph of *G. mellonella* larvae (Mean ± Standard Error).

Ağır metal (mg/L)	Plazmatosit Sayısı (Ort ± SH)*	Prohemosit Sayısı (Ort ± SH)*	Granülosit Sayısı (Ort ± SH)*	Sferülosit Sayısı (Ort ± SH)*	Önositoid Sayısı (Ort ± SH)*
Kontrol	565.3 ± 13.531 a	270.00 ± 3.05 a	128.0 ± 10.016 a	31.33 ± 5.206 a	19.0 ± 0.577 a
Cu (10 mg/L)	914.6 ± 4.409 b	79.00 ± 4.16 b	11.0 ± 0.577 b	11.33 ± 0.881 b	1.6 ± 0.333 b
Zn (30 mg/L)	842.3 ± 29.868 c	116.66 ± 23.49 b	37.0 ± 0.577 c	17.00 ± 0.577 b	1.3 ± 0.333 b
Cu +Zn (1:3)	895.6 ± 0.666 bc	78.33 ± 1.76 b	12.3 ± 1.333 b	10.33 ± 0.333 b	3.0 ± 0.577 b

\*SNK; Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiksel fark bulunmaktadır ( $P < 0.05$ ).

\*SNK; There is a statistical difference between the data shown in different letters ( $P < 0.05$ ).

## TARTIŞMA

Çevre kirliliğine sebep olan metal ve metalik bileşikler, genel olarak ekosistemlerin doğal bir bileşenidir. 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.

Böcek hemositlerinin sınıflandırılması için farklı hücre tipleri ve bunların çeşitli görevlerinin olduğu bilinmektedir. Lepidoptera’larda genelde yaygın beş tip hemosit prohemositler, granülositler, plazmatositler, sferülositler ve önositoidler tanımlanmıştır (Ling vd., 2005; Strand, 2008; Tan vd., 2013). Prohemositler diğer hemosit türlerinin öncüsüdür ve hemolenfte az miktarda bulunurlar (Lanot vd., 2001). Granülositler hemolenfte bol miktarda bulunurlar; yabancı cisimlerin yüzeyine güçlü bir şekilde yapışırlar, fagositoz ve enkapsülasyon gibi de işlev görürler. Plazmatositlerin şekli polimorfiktir; yabancı yüzeylere asimetric yayılırlar ve enkapsülasyon reaksiyonu sırasında kapsül oluşumuna katılırlar (Strand, 2008). Sferülositler yapışkan olmayan hemositlerdir ve bunların rolü hala bilinmemektedir, ancak kutiküler bileşenlerin taşınmasında yer aldıkları öne sürülmüştür. Önositoidler fenoloksidaz (PO) kademesinin ana bileşenlerini içeren yapışkan olmayan hemositlerdir (Lavine & Strand, 2002; Vogelweith vd., 2016). Böceklerde, hemositleri tanımlayabilmek ve sınıflandırabilmek için morfolojik, fonksiyonel ve histokimyasal özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir (Brehelin & Zachary, 1986; Lavine & Strand, 2002). Yapılan çalışmada, *G.mellonella* beşinci evre larvaların hemolenfindeki hemositler morfolojik olarak incelenmiş ve plazmatosit, prohemosit, sferülosit granülosit ve önositoid olmak üzere beş tip hemosit gözlenmiştir. Ashhurst ve Richards, (1964) yaptıkları çalışmada *G. mellonella* (Lepidoptera) larvalarının hemolenfinde beş tip hemosit bulunduğunu ve sunulan çalışmadan farklı bir hemosit tipi olan adipohemosit olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada *Culex quinquefasciatus*

(Diptera:Culicidae) larvalarında altı tip hemosit bulunduğunu ve bu hemositlerin prohemosit, plazmatosit, sferülosit, granülosit, önositoid ve adipohemosit olduğunu bildirmişlerdir (Brayner vd., 2005).

*G. mellonella* larvalarında hemositlerin yapısal özellikleri ile ilgili yapılan başka bir çalışmada plazmatosit, granüler hücreler, sferülositler ve önositoid olmak üzere dört tip kan hücresi olduğu gösterilmiştir (Wu vd., 2016). Strand ve Pech, (1995) Lepidoptera ordosuna ait bir türün hemositlerini morfolojik olarak incelediğinde prohemosit, granülosit, plazmatosit, önositoid ve sferülosit olduğunu bildirmişlerdir. Böcek türlerine bağlı olarak hemosit tiplerinin farklılık gösterdiği bilinmektedir (Gupta, 1979; Bang vd., 2014;2015).

Yapılan çalışmada, Cu ve Zn’ nun tek başına ve karışımlarının total hemosit sayısında azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir. Çevresel koşullardaki değişikliklerden etkilenen total hemosit sayısı patojenler, parazitler ve ksenobiyotikler (insektisit, ağır metal) gibi stres faktörlerinden de etkilenerek değişiklik göstermektedirler (Bergin vd., 2003; Wu & Yi, 2015). *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) larvalarının besinine farklı derişimlerde Cd ve Cu ilave edildiğinde, düşük Cd derişiminde total hemosit sayısı azalırken, yüksek Cd ve Cu derişimlerinde artmıştır. Ortamdaki stres faktörleri altında total hemosit sayısındaki azalma nedeniyle kan hücrelerinin dolaşımdan dokulara geçmiş olabileceği düşünülmektedir (Sendi vd., 2018).

*G.mellonella* larvalarının diferansiyel hemosit sayıları incelendiğinde; plazmatosit sayısı Cu, Zn ve Cu+Zn karışım uygulaması yapılan gruplarda kontrol gruba göre bir artış göstermiştir. Bu artışın sebebi, plazmatositlerin hemosöl duvarına metalleri yapıştırma özelliği ile biriktirdiğini ve bu kan hücresinin metallerle karşı dirençli bir etki göstermesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Sendi vd., 2018). Ayrıca plazmatositlerin amitoz ve mitoz bölünme özelliğinin olması nedeni ile diğer hemositlere göre hemolenfte sayılarının çok miktarda bulunabileceği düşünülmektedir.

Metal uygulaması yapılan gruplardaki prohemosit sayısında azalma meydana geldiği gözlenmiştir. *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarında yapılan bir çalışmada, 12.5 mg/kg Cd ve Cu derişimlerinde prohemosit sayısının azaldığını, Cd derişimlerinin granülosit sayısında artış olduğunu bildirmişlerdir (Sendi vd., 2018). Prohemositlerin metal stresine karşı bir tepki gösterdiği ve bu hücrelerin dolaşımında başka hücrelere dönüşebilmesinden dolayı bir azalma meydana gelebileceği düşünülmektedir (Levin, 2007). Granülosit sayısı, denenen tüm uygulama gruplarında önemli ölçüde azalma göstermiştir. Granülositlerin fagositozdan sorumlu olması ile içeri alınan yabancı maddeleri hidrolitik enzimler tarafından sindirebileceğinden dolayı bu kan hücresinin azaldığı düşünülmektedir. Sferülosit sayısı; Cu, Zn ve Cu+Zn karışım uygulaması yapılan gruplarda azalma olduğu gözlenmiştir. Önositoid sayısı ise, denenen tüm uygulama grupları azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Önositoidler, böceklerde fenoloksidaz (PO) ve tirozin enzimi içeren yapışkan olmayan hücrelerdir (McFarlane, 1974; Bagatto & Shorthouse 1996; Hackman, 1974; Tarek vd., 2010; Sendi vd., 2014). Cu, doğal bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan fenoloksidaz enzimi melanizasyona neden olduğundan önositoid ve sferülosit sayılarının azalmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Wu & Yi, 2015). Borowska ve Pyza, (2011) *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvaları üzerinde yapılan çalışmada, larvalar her bir metalin düşük ve yüksek yarı- subletal dozlarına (Cu 5 ve 1000 mg/kg, Zn 100 ve 2000 mg/kg, Cd 3 ve 50 mg/kg, Pb 20 ve 10,000 mg/kg) maruz bırakılmışlardır. Kök hücre olarak bilinen prohemositlerin sayısı artarken, fagositozdan sorumlu granülositlerin sayısının azaldığını bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) üzerine bir insektisit türü olan Nomoltun farklı derişimlerinin (50, 100 ve 500 ppm) uygulanması sonucunda hemolenfteki prohemosit, önositoid, plazmatosit ve granülosit sayılarında bir artış olduğunu fakat sferülosit sayısında azalma meydana geldiğini tespit edilmiştir. Sferülositler nomolt için en duyarlı hücreler iken, önositoidler en az etkilenen hücre olduklarını göstermiştir ve sonuç olarak total hemosit sayısının azaldığını bildirmiştir (Teleb, 2011). Wu ve Yi, (2015) *G. mellonella* larvalarına düşük dozlardaki Cr ve Pb ağır metallerinin uygulanması sonucunda, total hemosit sayısı, fagositik aktivite ve enkapsülasyonunun arttığını bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmada, metal uygulanan *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde bulunan prohemosit sayısının azalmasının immün savunma sistemine bir tepki gösterdiğini ve prohemositlerin diğer hemosit tiplerine farklılaşabilen bir kök hücre olması nedeniyle granülosit, sferülosit ve önositoid sayılarının azalmasıyla ilişkili

olabileceği düşünülmektedir. Metallerin tek başına ve karışım olarak uygulanması sonucunda, *G. mellonella*'nın bağışıklık savunma sistemi üzerine etkilerinin belirlenmesinde elde edilen bulgular sunulan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir (Borowska & Pyza, 2011; Teleb, 2011; Sendi vd., 2018). Ağır metaller, doğada tek başlarına bulunmayıp diğer metallerle birlikte bulunduğu ve metallerin organizmalarda birikim düzeyleri ile toksik etkilerinin ortamdaki diğer metallere bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu nedenle, yapılan çalışmada Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışım halinde uygulanmasının model organizma *G. mellonella* larvalarının bağışıklık sistemi üzerine etkilerinin belirlenmesi diğer türler ile yapılacak immünolojik çalışmalara ışık tutacaktır.

## TEŞEKKÜR

Yapılan çalışma, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı yüksek lisans tezidir ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FYL-2018-10328).

## KAYNAKLAR

- Ashhurst, D.E. & Richards, G. (1964).** Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L. *Journal of Morphology*, **114**, 247-254.
- Bagatto, G. & Shorthouse, J.D. (1996).** Accumulation of Cu and Ni in successivestages of *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae: Lepidoptera) near ore smelters at Sudbury, Ontario, Canada. *Environmental Pollution*, **92**(1), 7-12.
- Bang, K., Kwon, H. & Cho, S. (2014).** Characterization of the Hemocytes in Larvae of *Protaetia brevitarsis* seulensis: Involvement of Granulocyte-Mediated Phagocytosis. *PLoS ONE* **9**, e103620.
- Bang, K., Hwang, S., Lee, J. & Cho, S. (2015).** Circulating Hemocytes from Larvae of the Japanese Rhinoceros Beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the Cellular Immune Response to Microorganisms. *PLoS ONE* **10**(6), e0128519.
- Bargagli, R. (2000).** Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **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.
- Borowska, J. & Pyza, E. (2011).** Effects of heavy metals on insect immunocompetent cells. *Journal of Insect Physiology*, **57**, 760-770.
- Brehelin, M. & Zachary, D. (1986).** *Insect haemocytes: a new classification to rule out controversy*. In: Immunity in Invertebrates, ed. Brehelin, M. Springer Verlag, Berlin, pp. 36-48.
- Brayner, F.A., Araujo, H.R.C., Cavalcanti, M.G.S., Alves, L.C. & Peixoto, C.A. (2005).** Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Micron*, **36**, 359-367.
- Bronksil, J.F. (1961).** A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Pylalidae). *Journal of Lepidopteran Society*, **15**, 102-104.
- Büsselberg, D., & Florea, A.M. (2006).** Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals*, **19**, 419-427.
- Cerenius, L. & Soderhall, K. (2004).** The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **198**, 116-126.
- Chapman, R.F. (1998).** *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Chouhan, S., Verma, S.C. & Thakur, M. (2017).** Effect of Cadmium on Biology of Tobacco Caterpillar *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Nature Environment and Pollution Technology*, **16**(3), 883-888.
- Gupta, V. (2013).** Mammalian Feces as Bio-Indicator of Heavy Metal Contamination in Bikaner Zoological Garden, Rajasthan, India. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, **1**(5), 10-15.
- Hackman, R. (1974).** *Chemistry of the insect cuticle*. p. 215-270. In: "The Physiology of Insecta". 2nd ed. (M. Rockstein, ed.). Academic Press, Inc., London, UK, 535 pp.
- Jones, J.C. (1962).** Current Concepts Concerning Insect Hemocytes. *American Zoologist*, **2**, 209-246.
- Kanost, M.R., Jiang, H. & Yu, X.Q. (2004).** Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, **198**, 97-105.
- Kara, A. (2019).** *Cu, Zn ve karışımlarının Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera: Pylalidae) Larvalarının Hemosit tipleri ve Sayıları Üzerine Etkileri*. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana, Türkiye, 53s.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. & Meister, M. (2001).** Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, **230**, 243-257.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. (2002).** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1295-1309.
- Levin, D.M. (2007).** *An Integrin Required for the Encapsulation Immune Response in the tobacco hornworm Manduca sexta L. (Lepidoptera: Sphingidae)*. Kansas State University, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas.
- Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R. & Kiguchi, K. (2005).** Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. *Cell and Tissue Research*, **320**, 535-543.
- Mastore, M., Binda, R.S., Giovannardi, S., Scari, G. & Brivio, M.F. (2015).** Inducible factors with antimicrobial activity after immune challenge in the haemolymph of Red Palm Weevil (Insecta). *Innate Immunity*, **21**, 392-405.
- McFarlane, J. (1974).** The functions of copper in the house cricket and the relation of copper to vitamin E. *Canadian Entomology*, **106**(4), 441-446.
- Nappi, A.J. & Ottaviani, E. (2000).** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, **22**, 469-480.
- Negri, P., Maggi, M., Szawarski, N., Lamattina, L. & Eguaras, M. (2014).** *Apis mellifera* haemocytes in-vitro: what type of cells are they? Functional analysis before and after pupal metamorphosis. *Journal of Apicultural Research*, **53**, 576-589.
- Pandey, R., Dwivedi, M.K., Singh, P.K., Patel, B., Pandey, S., Patel, B., Patel, A. & Singh, B. (2016).** Effluences of heavy metals, way of exposure and bio-toxic impacts: an update. *Journal of Chemistry and Chemical Sciences*, **6**(5), 458-475.
- Ribeiro, C. & Brehelin, M. (2006).** Insect haemocytes: what type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, **52**, 417-429.
- Rosales, C. (2011).** Phagocytosis, a cellular immune response in insects. *International studies Journal*, **8**, 109-131.
- Sendi, J.J., Baghban, A., Zibae, A. & Khosravi, R. (2014).** Effect of heavy metals (Cd, Cu, and Zn) on feeding indices and energy reserves of the cotton boll worm *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Of Plant Protection Research*, **54**(4), 367-373.

- Sendi, J.J., Baghban, A. & Zibae, A. (2018).** Effect of essential and non-essential elements on cellular immune system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *International studies Journal*, **15**, 158-168.
- Shen, D., Li, M., Chu, Y., Lang, M., & An, C. (2016).** Cellular immune response of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae), to infection by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Eurasian Journal of Entomology*, **113**, 415-422.
- Strand, M. R., Beck, M. H. & Lavine, M.D. (2006).** Microplitis demolitor bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **61**, 134-145.
- Strand, M.R., 2008.** The insect cellular immune response. *Insect Science*, **15**, 1-14.
- Strand, M.R. & Pech, L.L., (1995).** Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. *Annu. Rev. Entomol.*, **40**, 31-56.
- Suganya , M., Karthi, S., & Shivakumar, M.S. (2016).** Effect of Cd and Lead Exposure on Tissue Specific Antioxidant Response in *Spodoptera litura*. *Free Radicals and Antioxidants*, **6**, 90-100.
- Tan, J., Xu, M., Zhang, K., Wang, X., Chen, S.Y., Li, T., Xiang, Z.H. & Cui, H.J. (2013).** Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, **59**, 595-603.
- Tarek, M.Y.E., Fouda, M.A., Hassan, M.I., Abd-Elghaphar, A.A. & Hasaballah, A.I. (2010).** Toxicological effects of some heavy metal ions on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Egypt Acad. Journal of Biological Science, F. Toxicology & Pest Control*, **2**(1), 63-76.
- Teleb, S.S. (2011).** Effect of nomolt on differential and total haemocytes in the Desert Locust *Schistocerca gregaria* Forskal (Orthoptera: Acrididae), *Journal of American Science*, **7**(11), 479-484.
- Tunçsoy, M. (2019).** Bakır oksit nanopartiküllerinin *Clarias gariepinus*'da bazı serum parametreleri üzerine etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, **4**(3), 387-392.
- Vogelweith, F., Moret, Y., Monceau , K., Thiéry, D. & Moreau, J. (2016).** The relative abundance of hemocyte types in a polyphagous moth larva depends on diet. *Journal of Insect Physiology*. **88**, 33-39.
- Wu, G. & Yi, Y. (2015).** Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*. **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.