

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe KARA

**Cu, Zn ve KARIŞIMLARININ *Galleria mellonella* L.
(Lepidoptera: Pyralidae) LARVALARININ HEMOSİT TİPLERİ
ve SAYILARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA- 2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Cu, Zn ve KARIŞIMLARININ *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) LARVALARININ HEMOSİT TİPLERİ ve SAYILARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayşe KARA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 12 / 09 /2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Dr.Öğr.Üyesi Pınar ÖZALP
DANIŞMAN

.....
Dr.Öğr.Üyesi Mehmet SULANÇ
ÜYE

.....
Dr.Öğr.Üyesi Benay TUNÇSOY
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2018-10328**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cu, Zn ve KARIŞIMLARININ *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) LARVALARININ HEMOSİT TİPLERİ ve SAYILARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayşe KARA

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÖZALP
Yıl: 2019, Sayfa: 53
Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÖZALP
: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SULANÇ
: Dr. Öğr. Üyesi Benay TUNÇSOY

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 olan etkileri incelenmiştir.

G.mellonella larvalarında prohemosit, granülosit, plazmatosit, sferülosit ve önositoid olmak üzere beş tip hemosit gözlenmiştir. Total ve diferansiyel hemosit sayıları ağır metallerden önemli ölçüde etkilenmiştir. Metallerin uygulanması sonucunda (72 saat sonunda) total hemosit sayısı (THS) azalmıştır. Prohemosit, granülosit, sferülosit ve önositoidlerde azalma plazmatosit sayılarında ise artış gözlenmiştir.

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 koymuştur.

Anahtar kelimeler : Çinko, Bakır, *Galleria mellonella*, Hemositler

ABSTRACT

MSc THESIS

EFFECTS OF CU, ZN AND ITS MIXTURES ON HEMOCYTE TYPES AND COUNTS OF *Galleria mellonella* L.LARVAE(Lepidoptera: Pyralidae)

Ayşe KARA

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Pınar ÖZALP
Year: 2019, Pages:53
Jury : Asst. Prof. Dr. Pınar ÖZALP
: Asst. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ
: Asst. Prof. Dr. Benay TUNÇSOY

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 and differential hemocyte counts were significantly affected by heavy metals. Total hemocyte count (THC) decreased when larvae exposed to metal for (72 hours). Decreased prohemocytes, granulocytes, spherulocytes and eunocytoids whereas plasmatocyte numbers increased.

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 studies on other species.

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

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Yapılan çalışmada biyolojik mücadelede kullanılan bir tür olan *Galleria mellonella* larvalarının, metal kirliliğinde iyi bir model organizma olarak kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu çalışmada Cu ve Zn' nin tek başına ve karışım halinde organizmaya alındığında toksik etkilerinin *G. mellonella* larvalarının hemosit tipleri ve sayıları üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

G. mellonella, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve $\%70 \pm 5$ bağıl neme sahip laboratuvar koşullarında Bronksil (1961) tarafından belirlenen yarı sentetik besin kültüründe (kepek, bal, saf su, gliserin ve petek) 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.

Cu, Zn ve Cu+Zn karışımı ile hazırlanan metal konsantrasyonları deneyde kullanılan peteklere daldırma metodu ile uygulanmıştır. Kontrol grubundaki peteklere ise saf su ile aynı yöntem uygulanmıştır. Hazırlanan her bir besin grubuna beşinci evredeki larvalardan 20 adet eklenmiştir. 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 alınmış, hemolenfleri çıkarılarak hemosit tipleri ve sayıları incelenmiştir.

Yapılan çalışmada, beşinci evre *G.mellonella* larvalarının kan hücreleri morfolojik olarak incelenmiş ve plazmatosit, önositoid, prohemosit, sferülosit ve granülosit olmak üzere beş tip hemosit gözlenmiştir. Cu, Zn ve Cu+Zn karışımli uygulama gruplarında total hemosit sayısının kontrol grubuna göre azalması istatistiksel açıdan önemli kabul edilmiştir ($P < 0.05$). Cu, organizmada kan hücrelerinin oluşumunu sağlayan bir elementtir. Ancak hemoglobinin sentezi sırasında Fe(demir) kullanımında katalizör olarak işlev görmesinden dolayı total hemosit miktarında diğer konsantrasyonlara göre bir artış göstermiştir. Ortamda

bulunan Zn metalinin azalma sebebinin hemositlerin dolařım sisteminden dokulara geçiřiyle iliřkili olabileceęi dūřınılmektedir. Ksenobiyotikler veya patojenler gibi yabancı maddelerle rekabete girerek immūn savunma sistemine cevap olarak total hemosit sayısında azalıř gōstermiř olabilir.

G.mellonella larvalarının diferansiyel hemosit sayıları üzerine etkileri incelendiğinde; plazmatosit sayısındaki artışın sebebi, plazmatositlerin hemosol duvarına metalleri yapıştırma özelliği ile biriktirdiğini ve bu kan hücresinin metallere karşı dirençli bir etki gōstermesiyle ilişkili olabileceği dūřınılmektedir. Çalışmada metal uygulanan *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde bulunan prohemosit sayısının azalmasının immūn savunma sistemine bir tepki gōsterdięini ve prohemositlerin diğer hemosit tiplerine farklılaşabilen bir kōk hücre olması nedeniyle granülosit, sferülosit ve önositoid sayılarının azalmasıyla ilişkili olabileceği dūřınılmektedir.

G.mellonella larvaları ile biyolojik mücadelede daha kısa zaman içerisinde sonuçların elde edilmesi ile hemosit sayılarında meydana gelen değişimler evre kirliliği düzeylerini değerlendirmede bir biyoindikatōr olarak kullanılabilirliğini ve başka türler üzerinde de yapılacak immūnolojik çalışmalara yol gōstereceęini ortaya koymuştur.

TEŞEKKÜR

Üniversiteye başladığımdan beri beni bilgi ve birikimleriyle eğiten, yüksek lisans döneminde de hiçbir zaman desteğini, yardımlarını ve tecrübesini esirgemeyen, sabrı ve hoşgörüsü ile daima bana yol gösteren Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden kıymetli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÖZALP' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında tecrübeleri doğrultusunda bana her türlü bilgilerini esirgemeyip yardımda bulunan, destek veren ve yol gösteren Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerinden değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Benay TUNÇSOY' a teşekkür ederim. Ayrıca bilgilerini ve desteğini esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SULANÇ 'a teşekkür ederim.

Akademik hayatımda bana bilgiler veren, güler yüzlü, sevecen ve çok değerli Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden kıymetli hocam rahmetli Sayın Prof.Dr. İskender EMRE'ye de yaptığı bütün desteklerden dolayı minnet duyarım.

Yardımlarını ve hoşgörüsünü esirgemeyen laboratuvar arkadaşım Biyolog Yağmur MEŞE' ye teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Uzman Biyolog Goulzar ULAYA ve Biyolog Rumeysa MEŞE' ye teşekkür ederim.

Çalışmanın yürütülmesinde desteklerini sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Benden yaşamım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve aldığım tüm kararlarda beni destekleyen annem Hatice KARA, babam Şakir KARA, kardeşlerime ve bir gülüşüyle her şeyi unutturan dünya tatlısı yeğenim Hamza KARA'ya da sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
3. MATERYAL VE METOD	17
3.1. MATERYAL	17
3.1.1. <i>Galleria mellonella</i> Stok Kültürünün Hazırlanması Ve Deney Larvalarının Elde Edilmesi	17
3.1.2. Ağır Metal Konsantrasyonlarının Hazırlanması	18
3.2.1. Metal Konsantrasyonlarının Larvalara Uygulanması	18
3.2.2. <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi	19
3.2.2.1. Total Hemosit Sayısı	19
3.2.2.2. Diferansiyel Hemosit Sayısı.....	21
3.2.3. Verilerin Değerlendirilmesi	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. BULGULAR	23
4.1.1. <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi	23
4.1.1.1. Total Hemosit Sayısı	25
4.1.1.2. Diferansiyel Hemosit Sayısı.....	26
4.2. TARTIŞMA.....	34

5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	53



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının total hemosit sayısındaki farklılıkları(Ortalama $\pm$ Standart Hata).....	25
Çizelge 4.2.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Plazmatosit sayısındaki farklılıklar(Ortalama $\pm$ Standart Hata).....	27
Çizelge 4.3.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Prohemosit sayısındaki farklılıklar(Ortalama $\pm$ Standart Hata).....	28
Çizelge 4.4.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Granülosit sayısındaki farklılıklar (Ortalama $\pm$ Standart Hata).....	30
Çizelge 4.5.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Sferülosit sayısındaki farklılıklar(Ortalama $\pm$ Standart Hata).....	31
Çizelge 4.6.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Önositoid sayısındaki farklılıklar(Ortalama $\pm$ Standart Hata).....	33



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Ağır metallerin hücre içi etkileri	1
Şekil 1.2.	<i>G. mellonella</i> 'nın yaşam evresi	3
Şekil 1.3.	Böcek hemositlerinin genel görünümleri PR:Prohemosit, PL: Plazmatosit, GR:Granülosit, SP:Sferülosit, CO: Önositoit	9
Şekil 3.1.	Yarı sentetik besin içerisinde <i>G. mellonella</i> larvaları.....	17
Şekil 3.2.	Ağır metal uygulaması yapılan petekler	19
Şekil 3.3.	Neubauer Hemositometresi	20
Şekil 4.1.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Prohemosit hücreleri.	23
Şekil 4.2.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Plazmatosit hücreleri.	23
Şekil 4.3.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Granülosit hücreleri	24
Şekil 4.4.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Önositoid hücreleri.	24
Şekil 4.5.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Sferülosit hücreleri.	24
Şekil 4.6.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Total hemosit sayısı.....	26
Şekil 4.7.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Plazmatosit sayısı	27
Şekil 4.8.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Prohemosit sayısı.....	29
Şekil 4.9.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Granülosit sayısı	30
Şekil 4.10.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Sferülosit sayısı	32
Şekil 4.11.	<i>G. mellonella</i> larvalarının hemolenfindeki Önositoid sayısı	33



SİMGELER VE KISALTMALAR

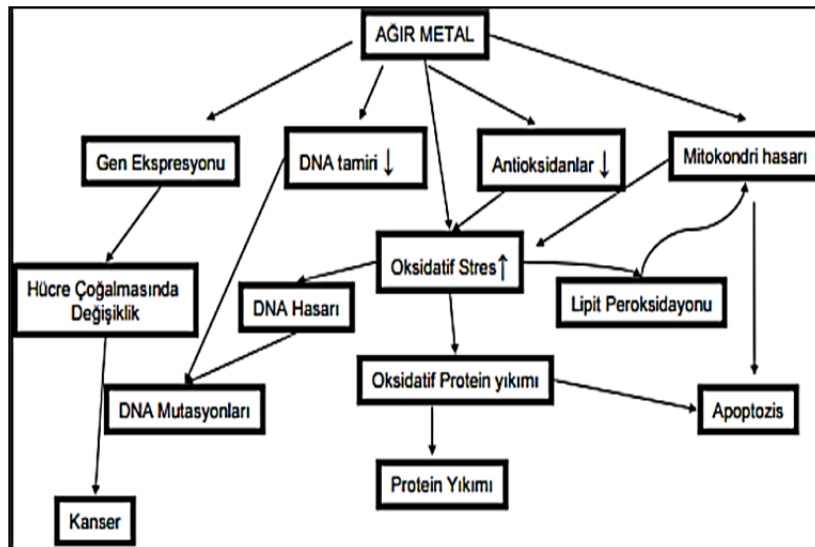
°C	: santigrad derece
cm	: santimetre
dk	: dakika
gr	: gram
mg	: miligram
ml	: mililitre
mm	: milimetre
ppm	: milyonda bir
sn	: saniye
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre
Ag	: Gümüş
AlCl ₃	: Alüminyum klorür
AMPs	: Antimikrobiyal peptidler
As	: Arsenik
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Fe	: Demir
GST	: Glutasyon-S-transferaz
Hg	: Cıva
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaCl	: Sodyum klorür

Na ₂ EDTA	: Di sodyum etilen diamin tetra asetik asit
Pb	: Kurşun
POD	: Peroksidaz
PO	: Fenoloksidaz
Pt	: Platin
Se	: Selenyum
SOD	: Süperoksit dismutaz
SNK	: Student Newman Keul's
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
Zn	: Çinko

1. GİRİŞ

Çevre kirliliği dünyanın bugüne kadar karşı karşıya kaldığı ciddi problemlerden biridir. Ağır metaller de, çevre kirliliğine neden olan önemli etkenlerden biri olarak bilinmektedir (Chouhan ve ark, 2017). Arsenik (As), cıva (Hg), gümüş (Ag), kurşun (Pb), demir (Fe) , kadmiyum (Cd), bakır (Cu), krom (Cr), çinko (Zn) ve platin (Pt) gibi nispeten yüksek yoğunlukta ve düşük miktarda toksik olan metaller "ağır metal" olarak kabul edilmektedir (Symon ve Hutton, 1986; Hawkes, 1997; Suganya ve ark, 2016; Sadhu ve ark, 2018).

Metal kirliliğinin başlıca kaynağı olan volkanik patlamalar, madencilik ve sanayi endüstrileri, fosil yakıtlarının yanması, hidroelektrik santralleri ve tarım sisteminin (Pandey ve ark, 2016) oluşturduğu toksik etkiler, organizmalarda birikerek canlılar için bir tehlike oluşturmaktadır. 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).



Şekil 1.1. Ağır metallerin hücre içi etkileri (İstanbulluoğlu,2011;Özbolat ve Tuli,2016).

Ağır metaller organizmaya besin, su ve hava yoluyla alınabilir, fakat aşırı miktarda alınan metaller organizmada birikerek ekosistemi bozmakta ve çoğu organizmanın yaşamı üzerinde bir toksik etki yaratmaktadır (Gupta, 2013; Suganya ve ark,2016).

Bakır (Cu), selenyum (Se) ve çinko (Zn) gibi metaller iz element olarak bilinmektedir. Bu metaller böceklerde büyüme ve fizyolojik gelişmeleri üzerinde belirli bir etkiye sahiptir (Suganya ve ark, 2016).

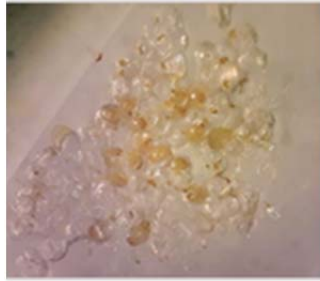
Redoks yapısına sahip bir element olan bakır hücrel demir metabolizması, hücrel solunum ve serbest radikal savunması için gereklidir (Gagnon ve ark, 2006). Enzim yapısına kofaktör olarak katılır (Dow, 2017). Organizmada sitokrom-C oksidaz, profenoloksidaz, hemosiyanin ve süper oksit dismutaz (SOD) gibi proteinlerin yapısında rol oynar. Yüksek konsantrasyonlarda ise proteinlerde denatürasyon ve fonksiyon bozukluğuna neden olabilir (Bertini ve ark,1994; Huang ve ark, 2012; Sendi ve ark, 2018).

Kentsel ve endüstriyel atıklar sonucu oluşan metal kirliliği organizmaya fazla alındığında çinkonun toksik özelliğinden dolayı hücrel metabolizmada farklı etkiler gösterebilmektedir. Hücrel süreçlerin düzenlenmesi, antioksidan tepki ve apoptozise karşı korunmada dahil olmak üzere, organizmada bir çok olayı gerçekleştiren yaklaşık 300 enzim ile ilişkili ve kofaktör bir etkiye sahiptir. Ayrıca hücrel ortamı ciddi biçimde rahatsız ederek oksidatif stresi artırabilir (Coleman, 1992; Koh, 2001; Kafel ve ark,2014). Çinko, karbonik anhidraz ve süper oksit dismutazda ve birçok DNA bağlayıcı proteinin yapısına katılan, çinko parmak proteinleriyle çeşitli enzimlerde, özellikle metalloproteinazlarda ve peptidazlarda aktif bölgeler oluşturan bir elementtir (Dow, 2017). Birçok enzim ve proteinin bileşeni olan çinko gen replikasyonunu ve transkripsiyonunu, protein sentezini, hormonlara bağlanma ve reseptör sentezinin yanı sıra sinyal iletimini de düzenlemektedir (Qiang ve ark, 2005).

Ağır metal kirliliği sadece hayvanlarda büyüme, üreme, hayatta kalma ve metabolizma ile değil aynı zamanda doğuştan gelen bağışıklık sisteminde de zararlı

etkilere neden olabilir. Bu nedenle böcekler de dahil olmak üzere birçok omurgasız hayvan, ağır metallerin toksisitesini incelemek ve çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmek için iyi bir model organizma olarak kabul edilir (Wu ve Yi, 2015) ve çevrenin kontaminasyonunda da yararlı biyoindikatörler olarak kullanılır (Borowska ve Pyza, 2011).

Çalışmada kullanılan *Galleria mellonella* L. (Büyük balmumu güvesi) Pyralidae familyası, Lepidoptera takımına ait holometabol bir böcektir. Bu böcekler yumurta, larva, pupa ve ergin yaşam evresine sahiptir (Kwadha ve ark, 2017). Hayat döngüsü yaklaşık olarak 7- 8 hafta sürmektedir. Yumurtadan çıktıktan sonra larvalar 7 evrede gelişimini tamamlar (Wojda, 2017) ve son evrelerinde beslenmeden kesilir (Nielsen ve Brister, 1979; Kwadha ve ark, 2017). Larvalar prepupa ve pupa dönemlerinden yaklaşık iki hafta sonra da erginleşir (Wojda, 2017). *G.mellonella* hava sıcaklığına uygun bölgelerde yaşayan, hızlı bir üreme döngüsüne sahip ve arıcılık sektörünü de ekonomik sıkıntılara uğratan zararlı bir tür olarak bilinmektedir.



(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 1.2. *G. mellonella* 'nın yaşam evresi (A)yumurta, (B)larva, (C)pupa,(D) ergin (A. Kara).

Canlıların önemli fizyolojik özelliklerinden biri de patojenleri içeren virüs, bakteri, fungus ve protozoalar gibi mikroorganizmalara karşı korunmaları ve bağışıklık oluşturmalarıdır (Tunaz, 2004). Edinilmiş bir bağışıklık sisteminden yoksun olan böcekler enfeksiyon ajanlara karşı hızlı ve etkili yanıtlar sağlayarak doğuştan gelen bağışıklık sistemlerine sahiptirler. 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 ve Ottaviani, 2000; Cerenius ve Soderhall, 2004; Kanost ve ark, 2004; Mastore ve ark, 2015b; Shen ve ark, 2016). Hücrel savunma yanıtı çeşitli hemosit türleri ile aracılık ettiği fagositoz, nodülasyon ve enkapsülasyonla ilgilidir (Lavine ve Strand, 2002; Negri ve ark, 2014; Wu ve ark, 2016).

Patojenik mikroorganizmaları içeren bakteri, mantar ve protozoalar, böceklerde fiziksel engelleri ortadan kaldıran sitotoksik peptid ve proteinlerle birlikte humoral bağışıklık sisteminde karşılaşılır (Hoffmann ve ark, 1994; Gillespie ve ark, 1997; Hetru ve ark, 1998; Garcia-Lara ve ark, 2005; Levin, 2007). Her bir böcek türü, patojenlere karşı hareket ederek kendine özgü sitotoksik molekülleri üretir (Burke, 1999). Bu moleküllerin ilk olarak yağ dokuda üretilerek epidermis hücreleri, bağırsak, malpigi tübülleri ve hemositler tarafından da sentezlendiği bilinmektedir (Brey ve ark, 1993; Lee ve Brey, 1995; Dunn ve ark, 1994; Russell ve Dunn, 1996; Gillespie ve ark, 1997; Levin, 2007). Melanizasyon, hemolenfin pıhtılaşması ve antimikrobiyal peptitlerin sentezinin oluşmasıyla humoral savunma işleminde, üç tip reaksiyon gerçekleşmektedir (Vilmos ve Kurucz, 1998). Melanizasyon, serin proteaz kaskadı ile aktif forma dönüştürülen fenoloksidaz enzimi tarafından katalize edilir (Ashida ve ark, 1998; Vilmos ve Kurucz, 1998).

İnaktif proenzim olan profenoloksidaz hemositlerde üretilir ve hücrenin patlaması ile serbest bırakıldıktan sonra kutikula içine taşınır (Ashida ve ark, 1995; Vilmos ve Kurucz, 1998). Kutikulaya taşınan enzim yara bölgesinin çevresinde

veya enkapsüle olmuş parazitlerin etrafında birikir (Bidochka ve ark, 1997; Vilmos ve Kurucz, 1998). Aktive edilen fenoloksidazlar hemolenf içerisindeki fenolik substratlardan kinonları meydana getirirler ve bu kinonlar bazı bölgelerde oligomerleşip melanin olarak birikirler (Vilmos ve Kurucz, 1998). Yara iyileşme sürecinde ve aynı zamanda *Manduca*, *Pseudolusia* ve *Drosophila* gibi bazı lepidoptera ve diptera böceklerde büyük patojenlere veya parazitlere karşı nodül ve kapsül oluşumu aktive edilir (Lavine ve Strand, 2001; Lavine ve Strand, 2002; Kanost ve ark, 2004; Nappi ve ark, 2009; Rosales, 2011).

Hemolenf pıhtılaşmasında böcekler diğer eklem bacaklılarla karşılaştırıldığında zaman eldeki bilgilerin oldukça az olduğu görülmektedir. Omurgasızlar, patojen bakterilerin vücut boşluğuna girip istila etmelerini önlemek için hemolenf pıhtılaşma mekanizmasına sahiptir (Theopold ve ark, 2002). Böceklerde hemolenf pıhtılaşmasında proteinlerin polimerizasyonu, hemositlerden salgılanan Ca^{+2} bağlı transglutaminaz enzimi tarafından katalizlenir (Bohn ve Barwing, 1984). Pıhtılaşma mekanizması dört basamaktan oluşur:

- I. Hemositlerin degranülasyonu ile hücre dışı agregatların oluşmasına yol açar. Oluşan agregatlar yara bölgesini sararak yumuşak veya primer pıhtı denilen yapının oluşumunu sağlar.
- II. Profenoloksidazın aktivasyon basamakları ve transglutaminaz sıralı olarak pıhtıda çapraz bağlar oluşmasına neden olur ve pıhtı kalınlaşır.
- III. Plazmatositler bu bölgeye çekilerek pıhtının çevresini kaplarlar ve kabuklaşarak vücut boşluğundan uzaklaştırırlar.
- IV. Yara bölgesinde epidermisin rejenerasyonu ortaya çıkar ve kabuğun yerini alır (Theopold ve ark, 2004).

Antimikrobiyal peptidler (AMPs) veya konak savunma peptidleri, canlının tüm yaşamı boyunca geniş spektrumlu mikrobik aktiviteyi gösteren doğal bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynamaktadır. Böcek AMP ' leri temel olarak

yağ doku, hemositler, sindirim sistemi, tükürük bezleri ve üreme yollarında üretilmektedir (Tsai ve ark,2016). Hastalık oluşturan mikroorganizmaların saldırımları sonucuyla oluşan humoral bağışıklık, organizmaların vücudunda attasin (attacins), sekropin (cecropins), difensin(defensins) ve dipterisinler (dipterocins) gibi antibakteriyal proteinlerin sentezlenmesi ile oluşmaktadır (Tunaz,2004).

Böcekler, açık dolaşım sistemine sahiptir (Dubovskiy ve ark, 2016). Hemolenf, böceklerde mevcut hücre dışı sıvı olan plazma bileşenleri ve hemosit olarak adlandırılan hücrelerden oluşmuştur (Borowska ve Pyza, 2011). Hemositler, hemosölde dolaşır ve hematopoietik organlar ya da hücre bölünmesi yoluyla üretilir (Gillespie ve ark, 1997; Lavine ve Strand, 2002; Strand, 2008; Tan ve ark, 2013; Vogelweith ve ark.2016).

Lepidoptera, Collembola, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Blattaria, Hemiptera ve Orthoptera takımları ile yapılan çalışmalarda morfolojik, sitokimyasal ve fonksiyonel özelliklere göre çeşitli hemosit tipleri tanımlanmıştır (Ahmad, 1988; 1992; Luckhart ve ark, 1992; Azambuja ve ark, 1991; Fenoglio ve ark, 1993;; Butt ve Shields, 1996; Sonawane ve ark, 1993; Joshi ve Lambdin, 1996; de Silva ve ark, 2000a ;Hernandez ve ark, 1999; Lavine ve Strand, 2002 ; Giulianini ve ark, 2003; Huang ve ark., 2010; Soares ve ark., 2013; Wu ve ark,2016). Bu hemositlerden en yaygın olanları prohemositler, plazmatositler, granülositler, sferülositler ve önositoidlerden oluşmaktadır (Ribeiro and Brehelin, 2006; Strand, 2008; Wu ve ark,2016).

Prohemositler; hemolenfte 4 - 10 µm genişliğinde ve 4 - 22 µm uzunluğunda, yuvarlak veya oval biçimde olan küçük hücrelerdir (Gupta, 1985; 1991; Brehelin ve Zachary 1986; Butt ve Shields, 1996, Chapman, 1998; Silva ve ark, 2002; Giulianini ve ark, 2003; Levin, 2007). Prohemositler sitoplazmanın hemen hemen tamamını dolduran, nispeten büyük bir çekirdeğe sahip olan, golgi aygıtı, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organellerin az olarak bulunduğu hücre tipleridir. Bu hemositler sentriol ve mikrotübül içermelerinden dolayı

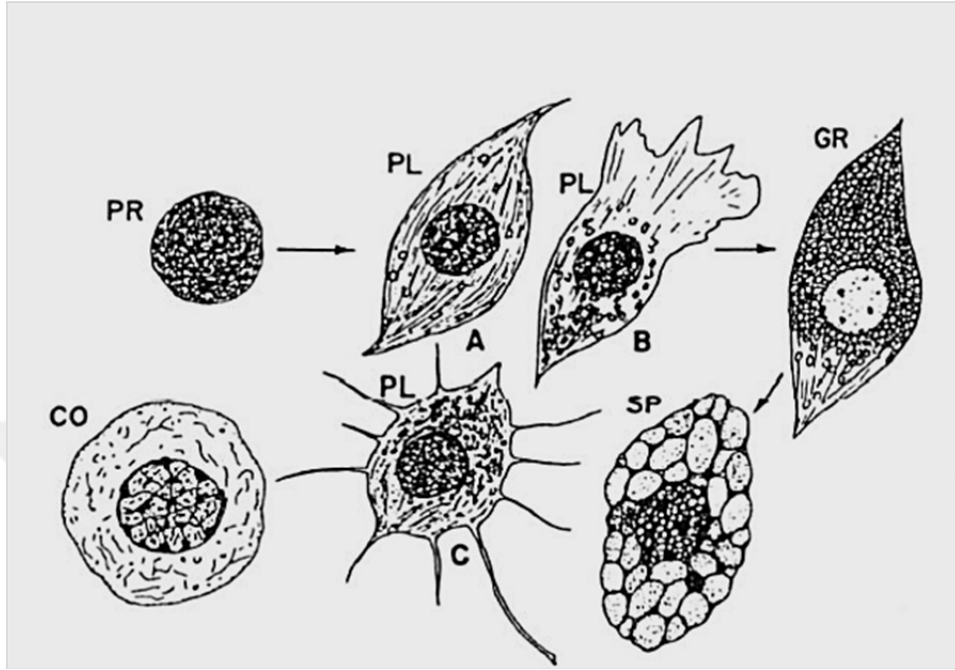
mitotik bir yapıya sahiptir (Levin, 2007). Prohemositler, hemosit tiplerinden bir veya daha fazlasına farklılaşabilen kök hücreler olarak bilinmektedir (Lavine ve Strand, 2002). Dolaşımdaki toplam hemosit miktarına göre oranları %1-7 arasında değişmektedir (Levin,2007).

Plazmatositler; 3 -40 µm arasında değişken boyuta sahip polimorfik hücrelerdir (Götz ve Boman, 1985; Silva ve ark, 2002; Levin,2007). Plazmatositler iğ şeklinde, küresel veya oval hücreler olarak bilinmektedir (Ribeiro ve Brehelin,2006). Çekirdek merkezi olarak konumlanmış olup, golgi aygıtı, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organelleri de içermektedir. Hemolenfte çok miktarda bulunan hemositlerden biridir ve toplam hemosit sayısının% 30 - 60'ını oluşturur (Levin, 2007). Sitoplazmasında lizozomal enzimler bulunur ve bu hemositler granüler hücrelerden daha büyüktür (Browne ve ark, 2013). Transmisyon elektron mikroskobunda birkaç yalancı ayak, pinositotik veziküller, vakuoller ve bazen de poliribozom gözlenmektedir (Ribeiro ve Brehelin,2006). Bu hemositler yabancı yüzeylere yapışabilme özelliğine sahiptir ve yara iyileşmesi, nodül oluşumu, fagositoz ve kapsülleme gibi bağışıklık yanıtlarında önemli bir rol oynarlar (Chapman, 1998, Lavine ve Strand, 2002; Levin, 2007).

Granülositler; 4 - 45 µm arasında bir boyuta sahip, oval veya küresel biçimdeki hücrelerdir (Levin, 2007). Sitoplazmasında küçük bir çekirdeğe sahiptir (Browne ve ark,2013). Granülositler, membrana bağlı granüller tarafından morfolojik olarak ayırt edilirler ve yabancı yüzeylere yapışma ve yayılma özelliği ile fagosit olarak da işlev görmektedir (Strand ve ark. 2006). Bu hemositlerin golgi aygıtı ve endoplazmik retikulumu iyi gelişmiş olup, çok sayıda ribozoma sahip, az miktarda mitokondri ve mikrotübül gibi organelleri vardır (Neuwirth, 1973). Çoğu araştırmacı, granüler hemositlerin ekzositozunun plazmatositleri o alana çekmede etkin olduğunu (Gillespie ve ark, 1997) ya da nodül veya kapsül üretiminde plazmatositlere yardım edebileceğini düşünmektedir (Pech and Strand, 1996; Ribeiro ve Brehelin,2006).

Sferülositler; 5 - 25 µm arasında bir büyüklüğe sahip olup, oval veya yuvarlak değişken şekilli hürelendir (Chapman, 1998; Levin,2007). Bu hemositlerin en belirleyici özelliği sitoplazmik boşlukta membrana bağımlı sferül (küresel) şekillerinin olmasıdır. Bu sferüller bir çeşit granüllü materyal içeriyor gibi görünmekte ve bunların histokimyasal analizleri mukopolisakkarit ve glukomukoprotein içerdiğini göstermektedir (Gupta,1985;Levin,2007). Sferülositlerin sitoplazmasında golgi aygıtı, endoplazmik retikulum, mitokondri, mikrotübül ve ribozom gibi organellere sahiptir (Neuwirth,1973). Sferülositlerin ipek üretimi, melanizasyon, pıhtılaşma, fagositoz ve hücre adhezyonu gibi işlevlere sahip olduğuna dair net bir bilgi henüz bulunmamaktadır (Levin,2007).

Önositoidler; 16-54 µm çapları arasında değişen, küresel ve oval şeklindeki en büyük hemosit tipidir (Levin,2007). Küçük bir çekirdeğe sahip olan önositoidlerde golgi aygıtı, mitokondri ve veziküller az gelişmiştir (Wu ve ark,2016). Homojen sitoplazmaya sahip bu hücreler çok sayıda serbest ribozom içermektedir (Brehelin ve Zachary,1986). Önositoidler, fenoloksidaz (PO) enziminin ana bileşenlerini içeren yapışkan olmayan hücrelerdir (Lavine ve Strand, 2002; Vogelweith ve ark,2016). Bu hücrenin fonksiyonları neredeyse bilinmemektedir, fakat fenoloksidaz aktivitesinin varlığı sayesinde yabancı cisimlerin etrafında veya kütikulanın koyulaşmasında kapsül ve melaninlerin oluşturulması sırasında rol oynayabileceklerini göstermektedir. Hemolenf içerisinde oldukça az miktarda bulunurlar (Brehelin ve Zachary,1986).



Şekil 1.3. Böcek hemositlerinin genel görünüşleri PR:Prohemosit, PL: Plazmatosit, GR:Granülosit, SP:Sferülosit, CO: Önosit (Nation, 2002)

Hemositler, böceklerde çeşitli savunma yanıtlarının oluşmasından sorumludur. Bu yanıtlar arasında fagositoz, nodül oluşumu ve enkapsülasyon oluşumu gözlenmektedir (Rosales,2011).

Fagositoz; küçük yabancı organizmaların yok edilmesi için omurgalı ve omurgasız hayvanlar tarafından kullanılan eski bir hücresel bağışıklık sürecidir. Yabancı bir madde, fagositin plazma membranındaki proteinler tarafından algılandığında ve ona bağlandığında fagositoz başlatılır. Sonra yabancı madde membranla sınırlı bir fagozomda içselleştirilir ve fagozom bir lizozom enzimi ile birleşir. İçeri alınan yabancı partikül hidrolitik enzimler tarafından sindirilir. Fagositoz hızlı gerçekleşen bir savunma yanıtıdır (Hillyer, 2016). Böceklerdeki granülosit ve plazmatositler fagositoz savunmasında rol alan hemositlerdir (Browne ve ark,2013).

Nodül oluşumu; böceklerde bakteriyel enfeksiyonlara karşı bir hücrel yanıt olarak bilinmektedir. Bu olay çok sayıda bakteri yakalayan hemosit agregatlarının oluşumundan sorumludur. Hemositler, hemolenf içerisindeki antimikrobiyal moleküller ile birlikte bakterileri sardığı zaman nodülasyon başlar (Rosales,2011) ve bunu genelde melanizasyon olayı takip etmektedir. Bu savunma sürecinde, granülositler yapışma özelliği sayesinde birbirine yapışır ve bakteri agregatlarını çevreleyen tabaka oluştururlar. Granülositler yapışkan yapının içeriğini hemolenfe bırakır. Plazmatositler, nodülün yüzey çevresinde toplanır ve yakalanmış bakterinin çevresinde melanin birikimi olur (Hillyer, 2016). Granülositler ve plazmatositler nodülasyonda görevli hemositlerdir, ancak önositoidler de profenoloksidaz (pro-PO) enzimi içermesi sebebiyle melanizasyon için gereklidir (Ratcliffe ve Gagen, 1977; Gillespie ve ark, 1997; Levin, 2007).

Enkapsülasyon; hemositlerin parazit, protozoa ve nematodlar gibi büyük patojenlere karşı yanıtı olan savunma mekanizmasıdır (Rosales,2011). Bu işlem yabancı bir cismin tanınmasıyla granüler hücreler eklendiğinde başlatılır ve temas halinde bu hücreler liziz ya da degranüle olarak yabancı maddeye bağlanır (Pech ve Strand,1996). Daha sonra granülosit tabakası birden fazla plazmatosit tabakası ile kaplanır ve bu kaplanmış hücrelere ek granülosit bağlanarak kapsül oluşur (Browne ve ark, 2013) ve oluşan kapsül melanize edilir (Ling ve ark,2006; Rosales,2011).

Farklı türlerle yapılan çalışmalarda ağır metallerin ve bunların organizmaya alındığında toksik etkilerinin kan hücreleri üzerine etkileri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Sunulan çalışmada, bakır (Cu) ve çinko(Zn)' nun tek başına ve karışım halinde farklı konsantrasyonlarının toksik etkilerinin *G.mellonella* larvalarının hemosit tipleri ve sayıları üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Qiang ve ark. (2005), *Spodoptera litura* larvaları üzerine yaptıkları çalışmada, besin ortamına farklı miktarda çinko eklemiş ve herbivor böcek olan *S.litura* larva hemositlerinin apoptozisini akış sitometrisi ile incelemişlerdir. Uygulamada doz miktarının artması ile larvanın hemolenfinde ve yağ dokusundaki çinko birikiminin hemolenfe göre daha fazla biriktiğini tespit etmişlerdir. Hemositlerin apoptozisi sonucunda, böcek besininde yüksek çinko konsantrasyonu ($1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) kontrol ve düşük çinko konsantrasyonuna ($50- 500 \text{ mg. kg}^{-1}$) göre apoptoz oranı daha yüksektir ve larvaların bu apoptozu indükleyebileceğini bildirmişlerdir.

Wu ve Yi (2015) , yaptıkları bir çalışmada *Galleria mellonella* larvalarına düşük dozlardaki Cr ve Pb ağır metallerinin uygulanması sonucunda; total hemosit sayısı, fagositik aktivite ve enkapsülasyonunun arttığını ve hemoenfteki SOD, CAT ve peroksidaz (POD) enzim aktivitelerinde de artış olduğunu bildirmişlerdir.

Sendi ve ark. (2014), *Helicoverpa armigera* Hübner' in (Lepidoptera: Noctuidae) üçüncü evre larvalarında, farklı konsantrasyonlarda Cd, Cu ve Zn içeren sentetik besin ortamında total protein, glikojen, kolesterol ve trigliserit seviyesi ölçülerek meydana gelen değişiklikleri tespit etmişlerdir. Kadmiyumun yüksek konsantrasyonunda sindirilebilirliğin arttığını, bakır içeren besinde total glikojen, protein ve kolesterol miktarının arttığını ve çinko içeren besinde glikojen düzeyinin arttığını söylemişlerdir. Ağır metallerin böcek immün sistemi üzerine olan etkilerinin araştırılması için daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir.

Sun ve ark. (2011), *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada; besine eklenen nikelin 5. dönem larvalarda düşük konsantrasyonda ($5 \text{mg} / \text{kg}$) fenoloksidaz aktivitesinin ve enkapsülasyon oranının arttığını ifade etmişlerdir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (10 mg/kg ' dan fazla) 24-72 saatlik zamanda enkapsülasyon oranının azaldığını tespit etmişlerdir.

Çalışmadan çıkardıkları sonuçlar, *S. litura* larvalarının Nikel'e karşı oluşturduğu bağışıklık ve gelişimsel yanıtın konsantrasyon ve uygulama süresine bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Suganya ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada *Spodoptera litura* larvalarına farklı konsantrasyonlara sahip Cd ve Pb metalleri besin ortamına konularak 24-48 saat sonra antioksidan parametrelerini incelemişlerdir. Larvalar, 48 saatte Cd 0.3, 0.44 ve 0.50 mg veya Pb 0.48 , 4.8 ve 9.6 mg konsantrasyonları içeren besinlere uygulandıktan sonra antioksidan enzimlerin aktivitesinde değişiklikler yapıldığını tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında SOD, CAT, GST gibi enzim aktivitelerinin artan konsantrasyona bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Borowska ve Pyza (2011), yaptıkları çalışmada *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvaları Cu, Zn, Cd ve Pb metalleri ile besin ortamına alınarak hemosit üzerine etkileri araştırılmıştır. 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 and 10,000 mg/ kg) maruz bırakılmışlardır. Metallere maruz kalan larvaların hemositlerinde stres proteinleri HSP70 ve HSP72 tespit edilmiştir. Kök hücre olarak bilinen prohemositlerin sayısı artarken, fagositozdan sorumlu granülositlerin sayısının azaldığını bildirmişlerdir.

Sendi ve ark. (2018), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarının besinine farklı konsantrasyonlarda kadmiyum ve bakır ilave etmişler ve hemosit sayılarının üzerine etkileri araştırılmıştır. Uygulama sonucunda 12.5 mg / kg Cd konsantrasyonunda total hemosit sayısı azalırken, 50 mg / kg Cd ve Cu konsantrasyonunda önemli bir şekilde artmıştır. Diferansiyel hemosit sayısının analizi sonucunda 12.5 mg / kg Cd ve Cu konsantrasyonlarında prohemositlerin azaldığını, Cd konsantrasyonunda granülositlerde artış olduğunu bildirmişlerdir.

Dubovskiy ve ark.(2011), yaptıkları çalışmada *G. mellonella* larvalarının besin içeriğine nikel ekleyerek GST, esterazlar, fenoloksidaz ve enkapsülasyon

aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Düşük doz konsantrasyonu($10 \mu\text{g.g}^{-1}$) nikel ile beslenen larvalarda GST, fenoloksidaz ve enkapsülasyon aktivitesinin arttığı ancak nikelin sublethal bir doz ($50 \mu\text{g.g}^{-1}$) ile beslenen larvalarda GST, esterase ve enkapsülasyon oranlarını artırırken fenoloksidaz aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir.

Ghasemi ve ark. (2014), *Ephestia kuehniella* ile yapılan çalışmada pyriproxyfen uygulaması sonucunda total hemosit ve plazmatosit sayılarının azaldığı ancak granülosit sayısının arttığını, metoxyfenozide uygulaması sonucunda total hemosit ve plazmatosit sayısının arttığını fakat granülosit sayısının azaldığını bulmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlarda, total hemosit ve plazmatosit sayılarının böceklerdeki immün yanıtlarda çok önemli bir rol oynadığını ve pyriproxyfenin bağışıklık mekanizmasını baskılayıcı yönü ile entegre kontrol çalışmalarında kullanılabilecek bir pestisit olduğunu bildirmişlerdir.

Ashhurst ve Richards (1964), yaptıkları çalışmada *G. mellonella* (Lepidoptera) larvalarında hemositlerin özelliklerini incelemişler ve larvaların hemolenfinde beş tip hemosit bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu hemositler; prohemosit, plazmatosit, adipohemosit, sferülosit ve önositoid olduğunu bildirmişlerdir.

Dubovskiy ve ark. (2013), *G. mellonella* ve *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada, organofosforlu bir insektisit olan primifosmetilin sublethal ve yarılethal dozlarının (LC_{10} ve LC_{50}) fenoloksidaz aktivitesini arttırdığını, enkapsülasyon ve hemosit sayısında da artış olduğunu bildirmişlerdir.

Brayner ve ark. (2005) , *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvalarında hemositlerin özelliklerini araştırdıkları çalışmada bu larvaların hemolenfinde altı tip hemosit bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu hemositler; prohemosit, plazmatosit, sferülosit, granülosit, önositoid ve adipohemosit olduğunu bildirmişlerdir.

Choi ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada kadmiyum, bakır, mangan, çinko, nikel, kobalt ve cıvanın her birinin ayrı ayrı sentetik besine katılması ile

G.mellonella'nın son evre larvalarında hemolenf ve doku ferritin üzerine etkileri incelenmiştir. Civa eklenen besin ile beslenen larvaların hemolenfinde ferritin miktarının arttığı, diğer ağır metallerin bulunduğu besin ile beslenen larvalarda doku ferritin miktarında da artış olduğu bildirilmiştir.

Sezer ve Özalp (2015), *Galleria mellonella*'nın (Lepidoptera) hemosit sayısı ve morfolojisi üzerinde yapmış oldukları çalışmada, juvenil hormonun analogu olan pyriproxyfen son evre larvalarına uygulanmıştır. Morfolojik özelliklere göre hemolenfte plazmatosit, prohemosit, sferülosit, granülosit ve önositoid olmak üzere beş hemosit türünü tespit etmişlerdir. 1, 5 ve 10 µg/ ml pyriproxyfen konsantrasyonlarına maruz kalan larvaların total hemosit sayısında anlamlı bir azalış olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, pyriproxyfen uygulamasının böceklerdeki hormonal yolların bozulmasına yol açarak total hemosit sayısını ve morfolojisini etkilediğini ayrıca endokrin sistemle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Neuwirth (1973), yaptığı çalışmada *G. mellonella* son evre larvalarından alınan hemolenf örneklerini incelemiş ve dört tip hemosit bulunduğunu tespit etmiştir. Bunlar; plazmatosit, granülosit, sferül hücre ve önositoidtir ve bunların histokimyasal özelliklerini incelemiştir.

Er ve Keskin (2016), yaptıkları çalışmada *G. mellonella* larvalarında bitki büyüme düzenleyicisi olan absisik asitin hemosit sayısını azalttığını ve farklı zaman dilimlerinde konsantrasyon artışına dayalı olarak granülosit ve plazmatosit sayılarında değişikliklerin olduğunu söylemişlerdir.

Teleb (2011), yaptığı çalışmada *Schistocerca gregaria* (Orthoptera:Acrididae) üzerine bir insektisit türü olan Nomoltun farklı konsantrasyonlarını (50, 100 ve 500 ppm) uygulayarak total hemosit sayısı ve farklı hemosit sayıları üzerine etkisini araştırmıştır. Uygulama sonucunda hemolenfteki prohemositlerin, önositoidlerin, plazmatositlerin ve granülositlerin sayısında bir artış olduğunu fakat sferülositlerin azaldığını tespit etmiştir. Sferülositler nomolt için en duyarlı hücreler iken, önositoidler en az etkilenen

hücre olduklarını göstermiştir. Elde edilen verilerin sonucunda, total hemosit sayısının azaldığını bildirmiştir.

Richards ve Parkinson (2000), yaptıkları çalışmada *Pimpla hypocondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae) zehirinin konak hemositlerinde sitotoksik etkisinin bulunduğu ve zehirin total hemosit sayısını azaltarak hemosit aracılı konak bağışıklık yanıtlarını baskıladığı bildirilmiştir.

Giulianini ve ark. (2003), *Cetonischema aeruginosa* (Coleoptera, Scarabaeidae) larvalarında yaptıkları çalışmada altı tip hemosit bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu hemositler; prohemosit, granülosit, plazmatosit, koagülosit, önositoid ve sferülositler olduğunu bildirmişlerdir.

Yılmaz (2013), yaptığı çalışmada *G.mellonella* besinine farklı dozlarda alüminyum klorür ekleyerek bu böceğin biyolojisine ve hemosit sayısına etkilerini tespit etmiştir. Sonuçta, $AlCl_3$ 'e bağlı olarak *G.mellonella* 'nın larva ve pupa gelişim süresinin ve ergin ömür uzunluğunun kısaldığını ancak larva, pupa ve ergin ağırlıklarının, gelişim ve eşey oranlarının, ergin morfolojisinin ve hemosit sayısının alüminyum klorürden etkilenmediğini bildirmiştir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. *Galleria mellonella* Stok Kültürünün Hazırlanması Ve Deney Larvalarının Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan larvalar, Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fiziyojisi Laboratuvar ortamında üretimi yapılan *G. mellonella* stok kültüründen elde edildi. Stok kültürün devam edebilmesi için 5 litrelik cam kavanozlara Bronskill (1961) tarafından belirlenen besin karışımı (kepek, bal, saf su, gliserin ve petek) eklendi ve kavanozlar içerisine ergin *G. mellonella* böcekleri bırakıldı. Kavanozların ağızları hava sirkülasyonu olacak şekilde tül ve delikli kapak ile kapatıldı. Hazırlanan kavanozlar $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve $70 \pm 5\%$ bağıl neme sahip ortam koşullarında ve günlük 12:12(Karanlık : Aydınlik) fotoperiyot uygulanan kültür odasında inkübe edildi. Kavanoz içerisine konulan ergin böcekler çiftleşerek besin üzerine yumurta bırakmaları sağlandı. Deneylerde bu yumurtaların açılmasıyla ortaya çıkan larvalar kullanıldı.



Şekil 3.1. Yarı sentetik besin içerisinde *G. mellonella* larvaları

3.1.2. Ağır Metal Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Metal konsantrasyonlarının hazırlanması için 0.393 gr bakır ve 0.208 gr çinko tartıldı. Tartılan metaller iki ayrı mezür içerisine konularak 1000 mL ultra saf suya tamamlandı. Bu şekilde bakır ve çinkodan 100 mg/ L' lik stok çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden 30 mg/L Zn ve 10 mg/L Cu konsantrasyonları ile Cu + Zn karışımları elde edildi.

Deneyde uygulama ve kontrol gruplarından oluşan 4 grup hazırlandı:

- 1) Kontrol grubu
- 2) Cu (10 mg/L)
- 3) Zn (30 mg/L)
- 4) Cu +Zn karışımı (10mg/L Cu+30mg/L Zn)

3.2. Metod**3.2.1. Metal Konsantrasyonlarının Larvalara Uygulanması**

Bakır, çinko ve bakır + çinko karışımı ile hazırlanan metal konsantrasyonları deneyde kullanılan peteklere daldırma metodu ile uygulandı. Kontrol grubundaki peteklere saf su ile uygulama yapıldı. Petekler daha sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Uygulama yapıldıktan sonra deney kaplarına konulan peteklerin üzerine nem ve küf oluşumunu engellemek amacıyla bir miktar kepek ilave edildi. Hazırlanan deney kapların her birine 20 adet beşinci evre *G.mellonella* larvaları eklendi. Larvaların hava sirkülasyonunu sağlayabilmesi için deney kaplarının üst kısmına eşit miktarda küçük delikler açıldı.

Kontrol ve uygulama grupları 72 saatlik deney süresi tamamlanana kadar gün aşırı kontrol edildi.



Şekil 3.2. Ağır metal uygulaması yapılan petekler

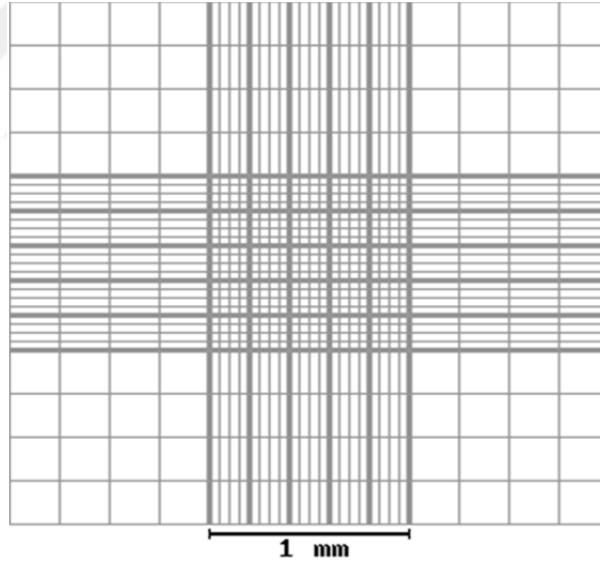
3.2.2. *G. mellonella* Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi

3.2.2.1. Total Hemosit Sayısı

G. mellonella larvaları 72 saat sonunda ağır metal içeren besin ortamından alındı. Hemolenf elde edebilmek için larvalar -20°C 'de 15-20 sn bekletilerek hareketlerinin yavaşlaması sağlandı. Hareketi sınırlanan larvalar %95'lik etanol ile dezenfekte edildikten sonra birinci arka bacak üstünden ince uçlu mikromakas ile kesilip mikropipet yardımıyla 10 μl hemolenf alınarak içerisinde N-phenylthiourea (Sigma Aldrich) (PTU) bulunan ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra ependorf içerisindeki hemolenften 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 başka bir ependorf tüpüne aktarıldı. 1:10 oranında seyreltme yapılan hücre süspansiyonundan 10 μl alınarak Neubauer hemositometresine yüklendi. Hemositler, Leica DM750 marka ışık mikroskopunda sayılarak, bir mililitre hemolenfteki hemosit sayısı Jones (1962) metodu kullanılarak hesaplandı.

Neubauer hemositometresi, üzerinde iki farklı sayım alanı bulunan ve bu sayım alanlarının bir çukurluk ile birbirinden ayrıldığı sayma lamıdır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane 1 mm^2 'lik bölümler (büyük kareler) bulunur. Bunlar 16 tane orta büyüklükte kareye ayrılır ($1/4 \times 1/4 = 1/16 \text{ mm}^2$). Ortada bulunan büyük kare ise 25 tane orta büyüklükte kareye ayrılır. Orta büyüklükteki karelerin etrafı çift çizgi ile çevrilidir. Her bir orta kare de 16 küçük kareye bölünür. Böylece, ortadaki alanda 25 tane orta kare, 400 tane küçük kare olduğu belirtildi. Bir küçük karenin alanı $1/20 \times 1/20 = 1/400 \text{ mm}^2$ 'dir. Sayım alanı dışında kalan kenarlar, sayım alanı yüzeyinden 0,1 mm yüksektir.

Sayım alanı üzerine hemositometrenin lameli konulunca, lamel ile sayım alanı yüzeyi arasında 0,1 mm'lik bir boşluk kalmaktadır. Böylece lam ve lamel arasında kalan her karenin hacmi hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Neubauer Hemositometresi

Hesaplama işlemi aşağıdaki formüle göre yapıldı. En büyük (1 mm^2 'lik) karenin hacmi $= 1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3$ $0,1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml}$ 'dir. Deney gruplarında hemositometre lamındaki 1 mm^2 'lik büyük karenin tamamı

sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi. Mililitredeki toplam hemosit sayısının hesaplanması için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

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

3.2.2.2. Diferansiyel Hemosit Sayısı

Bakır, çinko ve bakır + çinko karışımı ile uygulanmış peteklerle beslenen beşinci evre *G. mellonella* larvaları 72 saat sonunda besin ortamından alındı. Hemolenf elde edebilmek için larvalar -20 °C 'de 15-20 saniye bekletilerek hareketlerinin yavaşlaması sağlandı. Hareketi yavaşlayan larvalar %95'lik etanol ile dezenfekte edildikten sonra birinci arka bacak üstünden ince uçlu mikromakas ile kesilip mikropipet yardımıyla 5 µl hemolenf alındı. Alınan hemolenf daha önce alkolle temizlenmiş lamlar üzerine yayıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Hemositlerin fiksasyonu için lamlar 5 dakika süre ile metanol: asetik asit (3:1) çözeltisi içinde bekletildi ve tekrar kurumaya bırakıldı. Hemositlerin boyanabilmesi için hazırlanan %10 'luk Giemsa boyama (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution) çözeltisi kullanıldı. Tespit işleminden sonra kurutulan lamlar giemsa boyası içine alınarak 5 dk boyamaya bırakıldı. Boyama süresi tamamlandığında lamlar saf su ile yıkandı. Kuruma işlemi sonunda ksilolden geçirildi. Daimi preparat hazırlamak için entellan ile kapatıldı ve Leica DM750 marka ışık mikroskobunda hemosit tipleri belirlenerek sayım işlemi yapıldı.

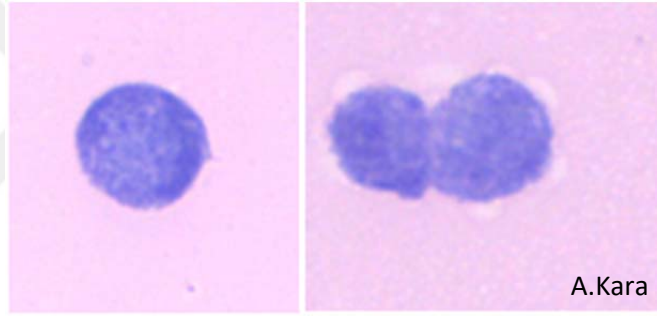
3.2.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Deneyler farklı zamanlarda üçer defa tekrar edildi. Bir deneyde elde edilen veriler, kontrol grubu ve metal uygulanmış diğer gruplarla beraber karşılaştırılarak değerlendirildi. İstatistiksel verilerin analizi SPSS 21.0 bilgisayar programında SNK (Student Newman Keul' s) testi kullanılarak yapıldı. Ortalamalar arası fark 0.05 olasılık seviyesinde F değerinden büyük olduğu zaman önemli kabul edildi ($P < 0.05$).

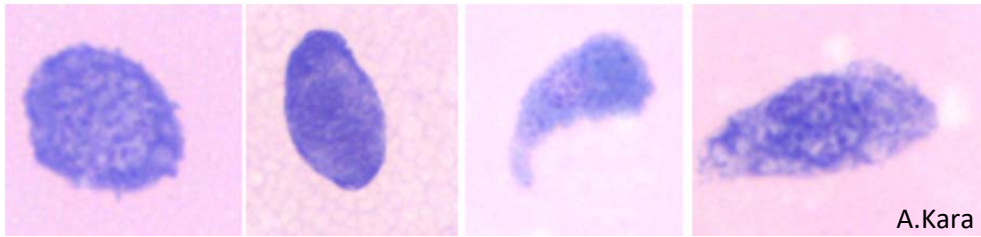


4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. Bulgular****4.1.1. *G. mellonella* Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi**

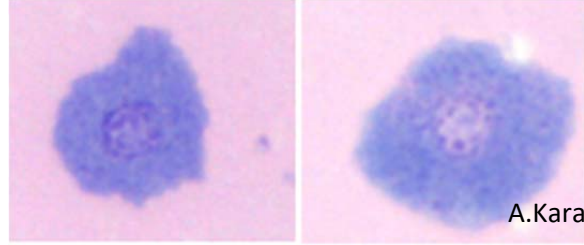
G. mellonella beşinci evre larvalarında çeşitli tipteki kan hücreleri Giemsa boyası ile hazırlanmış preparatların incelenmesi sonucu belirlendi. Boyanan hemositlerin çekirdekleri açık – koyu pembe, sitoplazmaları açık – koyu mavi renk olduğu gözlemlendi. Larvaların hemolenfi Leica DM750 marka ışık mikroskopunda incelenmesi sonucu plazmatosit, granülosit, prohemosit, sferülosit ve önositoid hemosit tipleri tespit edildi.



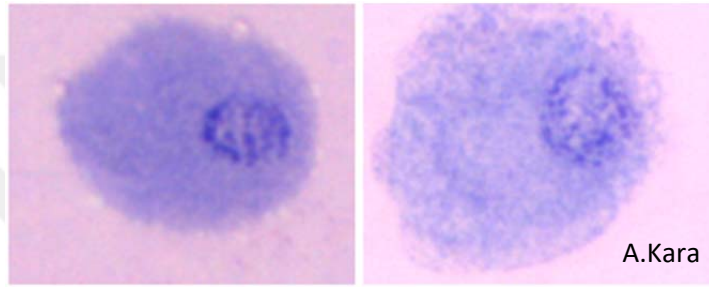
Şekil 4.1. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Prohemosit hücreleri (Ölçü Barı: 10 µm; X100).



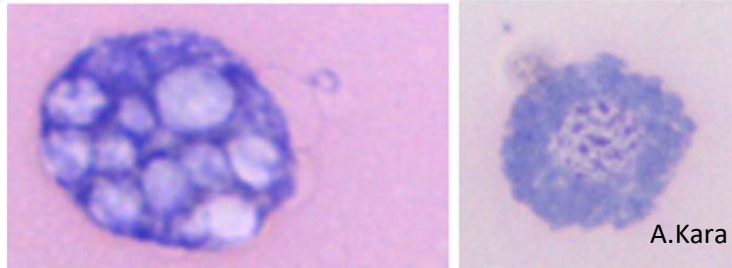
Şekil 4.2. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Plazmatosit hücreleri (Ölçü Barı: 10 µm; X100).



Şekil 4.3. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Granülosit hücreleri (Ölçü Barı: 10 μ m; X100).



Şekil 4.4. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Önositoid hücreleri (Ölçü Barı: 10 μ m; X100).



Şekil 4.5. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Sferülosit hücreleri (Ölçü Barı: 10 μ m; X100).

4.1.1.1. Total Hemosit Sayısı

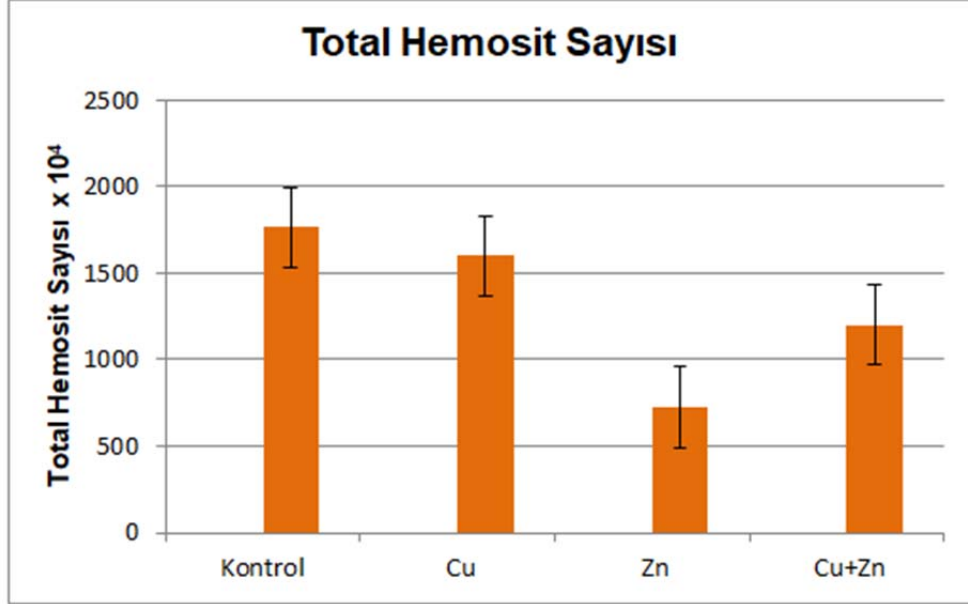
G. mellonella beşinci evre larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve Cu + Zn karışımlarının total hemosit sayıları üzerine analiz sonuçlarının etkileri Çizelge 4.1. ve Şekil 4.6. 'da sunulmuştur.

Yapılan çalışmada total hemosit sayısı incelendiğinde; kontrole oranla Cu, Zn ve karışım uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla %9, % 59 ve % 32 oranlarında azalma tespit edilmiştir. Cu ve Cu+Zn karışimli uygulama grupları ile Zn ve Cu+Zn karışimli uygulama gruplarında kontrole göre bir azalma meydana gelmiş ve bu azalma istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.1. *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının total hemosit sayısındaki farklılıkları(Ortalama $\pm$ Standart Hata)

Ağır metal (mg/ L)	Total Hemosit Sayısı ($\bar{X} \pm s\bar{x}$) *
Kontrol	1766,6 $\pm$ 44, 095 a
Cu(10 mg/L)	1600,0 $\pm$ 57,735 b
Zn (30 mg/L)	725,0 $\pm$ 14, 433 c
Cu +Zn (10:30 mg/L)	1200,0 $\pm$ 28, 867 d

*SNK; Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur($P > 0.05$).



Şekil 4.6. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Total hemosit sayısı

4.1.1.2. Diferansiyel Hemosit Sayısı

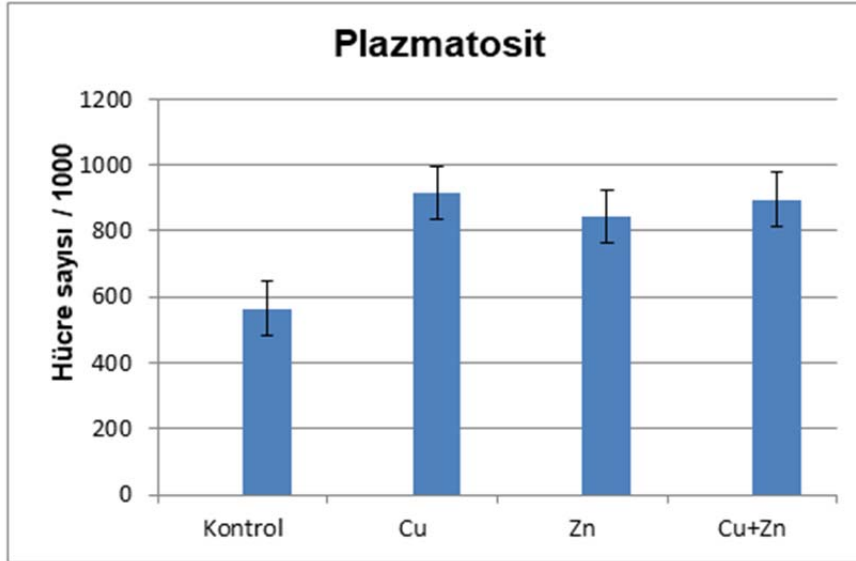
G. mellonella beşinci evre larvalarının hemolenfinde 10 mg/L Cu ve 30mg/L Zn metallerinin tek başına ve Cu + Zn (10+30 mg/L) karışımlarının diferansiyel hemosit sayıları üzerine analiz sonuçlarının etkileri Çizelge 4.2. - 4.6.'da ve Şekil 4.7. – 4.11.'de sunulmuştur.

Plazmatosit sayısının analizi sonucu elde edilen veriler incelendiğinde, kontrol grubunda 565.33 iken Cu, Zn ve Cu + Zn karışımındaki besin gruplarında sırasıyla 914.66, 842. 33 ve 895.66 olarak tespit edilmiştir.72 saatlik etki süresi sonucunda kontrole oranla Cu, Zn ve karışım uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla % 62, % 49 ve % 58 oranlarında artış göstermiştir. Cu ve Cu+ Zn karışimli uygulama grupları ile Zn ve Cu + Zn karışimli uygulama grupları kontrole göre bir artış meydana gelmiş ve bu artış istatistiki açıdan önemli kabul edilmiştir ($P < 0.05$). 72 saatlik uygulama sonrası larvaların hemolenfinde en fazla bulunan hemosit tipinin plazmatosit olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Plazmatosit sayısındaki farklılıklar(Ortalama $\pm$ Standart Hata)

Ağır metal (mg/L)	Plazmatosit Sayısı ($\bar{X} \pm s\bar{x}$) *
Kontrol	565,33 $\pm$ 13,531 a
Cu (10 mg/L)	914,66 $\pm$ 4,409 b
Zn (30 mg/L)	842,33 $\pm$ 29,868 c
Cu +Zn (10:30mg/L)	895,66 $\pm$ 0,666 bc

*SNK;Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur($P > 0.05$).



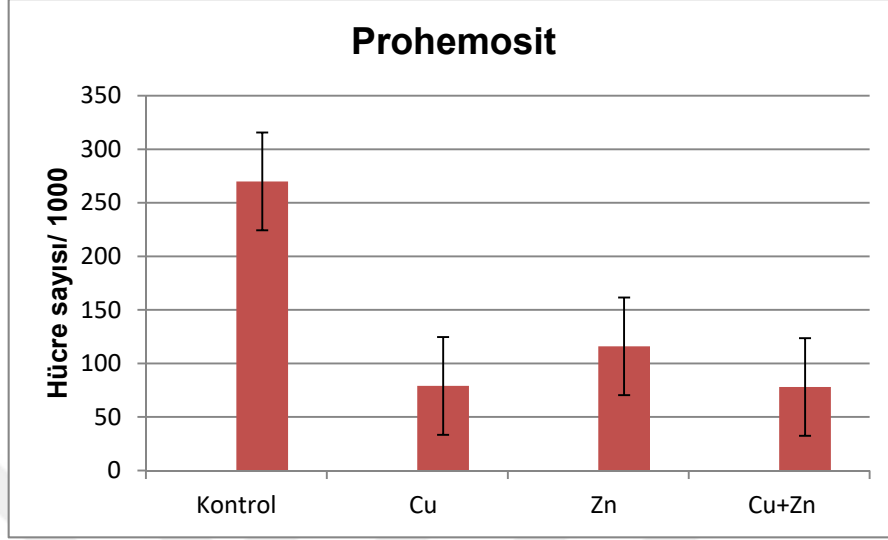
Şekil 4.7. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Plazmatosit sayısı

Prohemosit sayısı ile ilgili veriler incelendiğinde; Cu ve Cu+Zn karışımı besin gruplarında kontrol grubuna göre önemli bir azalma gözlenmiştir. Cu ve Cu+Zn grubu kendi aralarında kıyaslandığında önemli bir fark bulunmamıştır. Zn içeren besin grubu Cu+Zn karışımı gruba göre önemli bir artış göstermiş fakat istatistiki açıdan önemli kabul edilmemiştir. 72 saat sonra kontrole oranla Cu, Zn ve karışım uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla % 71,% 57 ve % 71 oranlarında azalma tespit edilmiştir. İncelenen tüm uygulama grupları kontrole göre karşılaştırıldığında istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Çizelge 4.3. *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Prohemosit sayısındaki farklılıklar(Ortalama $\pm$ Standart Hata)

Ağır metal (mg/ L)	Prohemosit Sayısı ($\bar{X} \pm s\bar{x}$) *
Kontrol	270,00 $\pm$ 3,055 a
Cu(10 mg/L)	79,00 $\pm$ 4,163 b
Zn (30 mg/L)	116,66 $\pm$ 23,497 b
Cu +Zn (10:30 mg/L)	78,33 $\pm$ 1,763 b

*SNK; Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur($P > 0.05$).



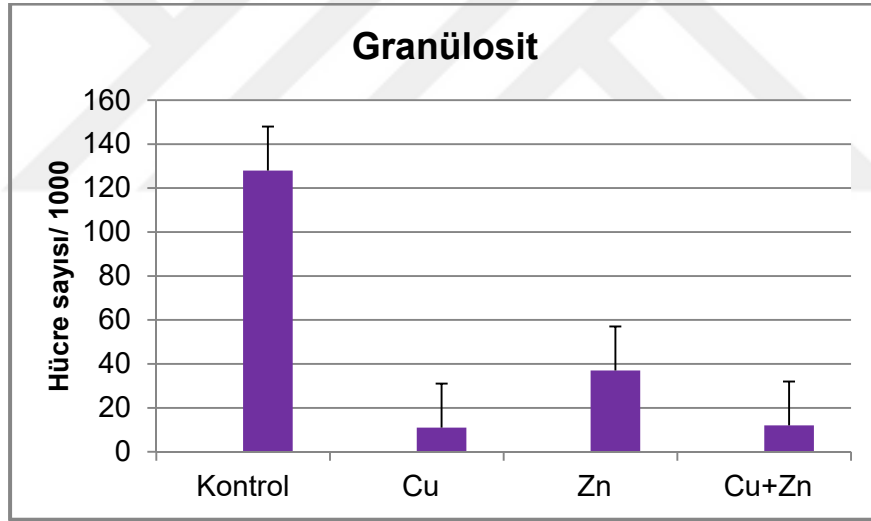
Şekil 4.8. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Prohemosit sayısı

Granülosit sayısı; Cu ve Cu + Zn karışımli uygulama grupları kontrol grubuna göre önemli bir şekilde azalmıştır. Cu ve Cu + Zn karışımli besin grupları kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman istatistik açısından önemli bulunmamıştır. Zn uygulama grubu ve Cu + Zn karışımli uygulama grubu kontrole göre önemli bir azalma göstermiş ve bu azalma istatistiki açıdan önemli kabul edilmiştir ($P < 0.05$). Granülosit sayısı, kontrole oranla Cu, Zn ve karışım uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla %91, % 71 ve % 90 oranlarında azalma tespit edilmiştir. Denenen tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir.

Çizelge 4.4. *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Granülosit sayısındaki farklılıklar (Ortalama±Standart Hata)

Ağır metal (mg/ L)	Granülosit Sayısı ($\bar{X} \pm s\bar{x}$) *
Kontrol	128,00 $\pm$ 10,016 a
Cu (10 mg/L)	11,00 $\pm$ 0,577 b
Zn (30 mg/L)	37,00 $\pm$ 0,577 c
Cu +Zn (10:30mg/L)	12 ,33 $\pm$ 1,333 b

*SNK;Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur(P> 0.05).



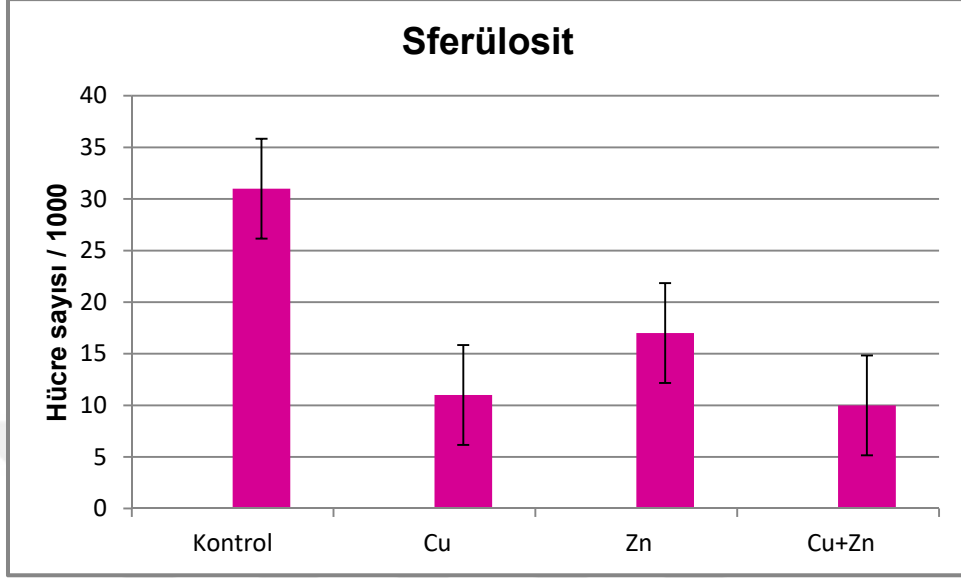
Şekil 4.9. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Granülosit sayısı

Sferülosit sayısı ile ilgili veriler incelendiğinde; kontrol grubu 31.33 iken Cu 11.33, Zn 17.0 ve Cu + Zn karışımı 10.33 olarak tespit edilmiştir. Cu, Zn ve Cu+Zn karışımli uygulama gruplarında kontrol grubuna göre bir azalma meydana gelmiş ve bu azalma istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Zn uygulama grubunda, Cu+Zn karışımli gruplara göre bir artış gözlenmiş ve kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiki bir fark bulunmamıştır. Cu ve Cu+Zn karışım grupları kendi aralarında kıyaslandığı zaman istatistiksel olarak önemli kabul edilmemiştir ($P > 0.05$). Sferülosit sayısı, kontrole oranla Cu, Zn ve karışım uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla % 64, % 46 ve % 67 oranlarında azalma gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Sferülosit sayısındaki farklılıklar (Ortalama $\pm$ Standart Hata)

Ağır metal (mg/ L)	Sferülosit Sayısı ($\bar{X} \pm s\bar{x}$) *
Kontrol	31, 33 $\pm$ 5, 206 a
Cu(10 mg/L)	11, 33 $\pm$ 0, 881 b
Zn (30 mg/L)	17, 00 $\pm$ 0, 577 b
Cu +Zn (10:30 mg/L)	10 , 33 $\pm$ 0, 333 b

*SNK; Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur ($P > 0.05$).



Şekil 4.10. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Sferülosit sayısı

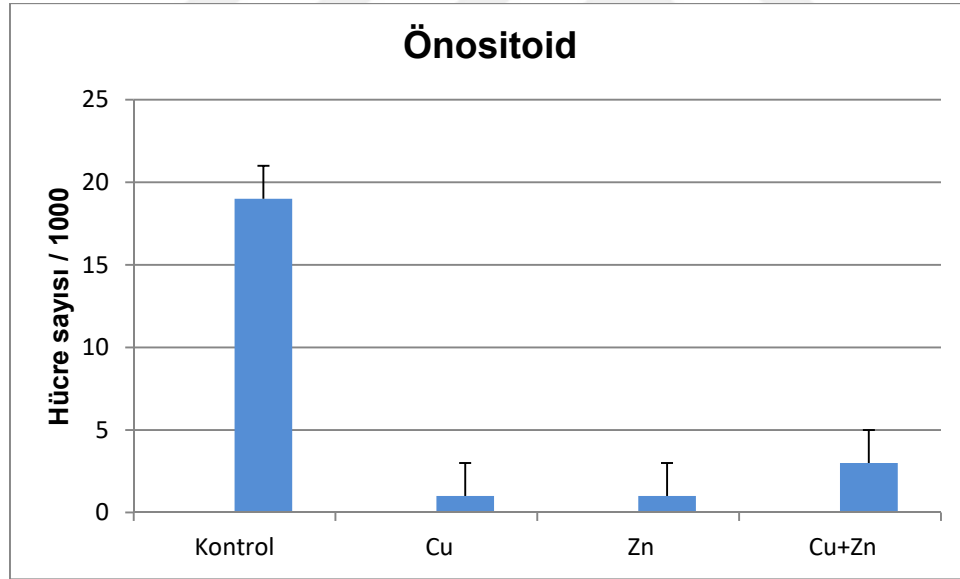
Önositoid sayısı denenen tüm uygulama gruplarında kontrol gruba göre önemli derecede bir azalma göstermiş ve istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir ($P < 0,05$). Zn ve karışım uygulama grubu (Cu+Zn) ile Cu ve karışım uygulama grupları (Cu+Zn) kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Önositoid sayısı, kontrole oranla Cu, Zn ve karışım uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla % 91, % 93 ve % 84 oranlarında azalma tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada larvaların hemolenfinde en az bulunan hemosit tipinin önositoid olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışımlarının Önositoid sayısındaki farklılıklar(Ortalama $\pm$ Standart Hata)

Ağır metal (mg/L)	Önositoid Sayısı ($\bar{X} \pm s\bar{x}$) *
Kontrol	19,00 $\pm$ 0, 577 a
Cu (10 mg/L)	1,66 $\pm$ 0, 333 b
Zn (30 mg/L)	1,33 $\pm$ 0, 333 b
Cu +Zn (10:30 mg/L)	3,00 $\pm$ 0, 577 b

*SNK; Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur($P > 0.05$).



Şekil 4.11. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki Önositoid sayısı

4.2. Tartışma

Sunulan çalışmada Cu, Zn ve Cu+Zn karışımı ile hazırlanan metal konsantrasyonları peteklere daldırma metodu uygulanarak *Galleria mellonella* larvalarının hemosit tipleri ve sayıları üzerine olan etkileri araştırıldı.

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).

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.

Birçok omurgalı ve omurgasız hayvan, metallerin toksisitesini incelemek ve çevresel kirlilik düzeylerini değerlendirmek için model organizma olarak kullanılmaktadır (Wu ve Yi, 2015). Çalışmada kullanılan *G. mellonella* (L.) larvaları hızlı bir üreme döngüsüne sahip, yaşam evresinin kısa olması ve etik sorunlara yol açmayan bir model organizma olarak kabul edilebilir.

Böceklerin bağışıklık sisteminde hemositler savunma mekanizmasının önemli bir kısmını temsil etmektedir (Wu ve ark, 2016). Böceklerdeki hücresel savunma yanıtları fagositoz, nodülasyon ve enkapsülasyon gibi hemositler aracılığı ile oluşan immün yanıtları içermektedir (Strand ve Pech, 1995; Schmidt ve ark, 2001; Lavine ve Strand, 2002).

Böcek hemositleri morfoloji, fonksiyonel ve moleküler özellikler tarafından belirlenen spesifik türlere farklılaşabilen mezodermal kökenli kök hücrelerden oluşmaktadır (Lavine ve Strand, 2002). Hemositlerin 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 ve ark, 2005; Strand, 2008; Tan ve ark, 2013). Prohemositler diğer hemosit türlerinin öncüsüdür ve hemolenfte az miktarda bulunurlar (Lanot ve ark, 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 asimetrik 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 ve Strand, 2002; Vogelweith ve ark, 2016).

Böceklerde, hemositleri tanımlayabilmek ve sınıflandırabilmek için morfolojik, fonksiyonel ve histokimyasal özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir (Brehelin ve Zachary, 1986; Lavine ve Strand, 2002).

Yapılan çalışmada, *G.mellonella* beşinci evre larvaların hemolenfindeki kan hücreleri 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 ve ark, 2005).

G. mellonella larvalarında hemositlerin ultrayapısal ve karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmada plazmatosit, granüler hücreler, sferülositler ve önositoid olmak üzere dört tip kan hücresi olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark, 2016). Strand ve Pech (1995), Lepidoptera ordosuna ait kan hücrelerini morfolojik olarak incelediğinde prohemosit, granülosit, plazmatosit, önositoid ve sferülosit olduğunu

bildirmişlerdir. Böcek türlerine bağlı olarak hemosit tiplerinin farklılık gösterdiği bilinmektedir (Gupta, 1979; Bang ve ark, 2014;2015).

Sunulan çalışmada, Cu, Zn ve Cu+Zn karışımı uygulama gruplarının total hemosit sayısının kontrol grubuna göre azalması istatistiki açıdan önemli kabul edilmiştir. Cu, organizmada kan hücrelerinin oluşumunu sağlayan bir elementtir. Ancak hemoglobinin sentezi sırasında Fe (demir) kullanımında katalizör olarak işlev görmesinden dolayı (Aksu, 2018) total hemosit miktarında diğer konsantrasyonlara göre bir artış göstermiştir. Ortamda bulunan Zn metalinin azalma sebebinin hemositlerin dolaşım sisteminden dokulara geçişiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ksenobiyotikler veya patojenler gibi yabancı maddelerle rekabete girerek immün savunma sistemine cevap olarak total hemosit sayısında azalış göstermiş olabilir.

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). *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarının besinine farklı konsantrasyonlarda Cd ve Cu ilave edildiğinde, düşük Cd konsantrasyonunda total hemosit sayısı azalırken, yüksek Cd ve Cu konsantrasyonunda önemli bir şekilde artmıştır. Ortamdaki stres faktörleri altında total hemosit sayısındaki azalma nedeniyle kan hücrelerinin dolaşımdan dokulara geçmiş olabileceğini göstermektedir (Sendi ve ark, 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 metallere karşı dirençli bir etki göstermesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Sendi ve ark, 2018). Ayrıca plazmatositlerin amitoz ve mitoz bölünme özelliğinin olması nedeni ile diğer hemositlere göre hemolenfte sayılarının çok miktarda bulunabileceği düşünülmektedir . Prohemosit sayısında uygulama grupları kontrol

grubu ile karşılaştırıldığında azalma gözlenmiştir. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarında yapılan bir çalışmada, 12.5 mg/kg Cd ve Cu konsantrasyonlarında prohemositlerin azaldığını, Cd konsantrasyonunda granülositlerde artış olduğunu bildirmişlerdir (Sendi ve ark, 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 karışımli uygulama grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma olduğu gözlenmiştir. Ancak kendi aralarında karşılaştırıldığında Zn uygulama grubu, Cu ve Cu+Zn karışımli gruplara göre bir artış göstermiştir. Önositoid sayısı incelendiğinde, denenen tüm uygulama grupları kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak önemli derecede azalma göstermiştir. Önositoidler, böceklerde fenoloksidaz (PO) ve tirozin enzimi içeren yapışkan olmayan hücrelerdir (McFarlane, 1974; Bagatto ve Shorthouse 1996; Hackman, 1974; Tarek ve ark, 2010; Sendi ve ark, 2014). Cu, doğal bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan fenoloksidaz enzimi melanizasyona neden olduğu için (Wu ve Yi, 2015) önositoid ve sferülosit sayılarının azalmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

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. Metallere maruz kalan larvaların hemositlerinde stres proteinleri HSP70 ve HSP72 tespit edilmiştir. 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 konsantrasyonlarının (50, 100 ve 500 ppm) uygulanması sonucunda hemolenftteki

prohemositlerin, önositoidlerin, plazmatositlerin ve granülositlerin sayısında bir artış olduğunu fakat sferülositlerin azaldığını tespit etmiştir. 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 ve hemoenftteki SOD, CAT ve peroksidaz (POD) enzim aktivitelerinde de artış olduğunu bildirmişlerdir.

İstatistiki açıdan genel olarak incelendiğinde, total hemosit sayısında azalış ve plazmatosit sayısında da bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Diferansiyel hemosit sayılarından prohemosit, granülosit, sferülosit ve önositoid sayılarında ise bir azalma olduğu gözlenmiştir.

Yapılan çalışmada, metal uygulanan *G. mellonella* larvalarının hemolenfide 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 ve Pyza,2011; Teleb, 2011; Sendi ve ark, 2018).

Farklı böcek türleri ve *G. mellonella* larvaları ile yapılan çalışmalar, metallere maruz kalan böceklerdeki kan hücrelerinin morfolojik, histokimyasal, biyokimyasal ve immün savunma sistemini etkilediğini göstermektedir. Cu, Zn ve Cu+Zn karışımlı metal 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.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmada, *Galleria mellonella* larvalarında bakır, çinko ve bakır+çinko karışım uygulamalarının immünolojik etkilerinin belirlenmesiyle, larvanın hemolenfinde bulunan diferansiyel ve total hemosit sayılarındaki farklılıklar tespit edilmiştir.

Memelilerle benzer immün sistemine sahip olması nedeniyle son yıllarda *G. mellonella*'nın model organizma olarak kullanımı artmıştır. Ağır metallerin bakteri, alg, zooplankton ve balıklar üzerine etkileri araştırılmış ve toksik birikimlere yol açtığı yapılan birçok çalışmalarla tespit edilmiştir. Buna rağmen böcek türleriyle yapılan çalışmalarda ağır metaller ve bunların toksik etkilerinin hemositler üzerine etkileri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Cu, Zn ve Cu+Zn karışım uygulamalarında diferansiyel hemosit sayılarında (prohemosit, granülosit, plazmatosit, önositoid ve sferülosit) artış ve azalışlar göstermiştir. Denenen tüm besinlerdeki total hemosit sayılarındaki azalmanın sebebi; hemositler ile oluşan fagositoz, enkapsülasyon ve nodülasyon gibi immün savunma yanıtlarının metale maruz kalan böceklerin hemolenfindeki toksisite düzeyine bağlı olarak meydana gelmektedir.

Yapılan çalışmada organizmaya alınan metallerin, kan hücrelerindeki proteinlere bağlanarak hemositlerin fonksiyonlarını etkilediği görülmüştür. Ayrıca çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmede *G.mellonella*'nın bir biyoindikatör olarak kullanılacağı ve başka türler üzerinde yapılacak immünolojik, fizyolojik ve morfolojik çalışmalara da ışık tutmasını sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Ahmad, A., 1988. Free hemocytes in adult *Polistes hebroeus* Fabr.(Hymenoptera: Vespidae). J. Entomol. Res. 12, 28–35.
- Ahmad, A., 1992. Study of haemocytes of two coleopterous insects, *Aulacophora foveicollis* Lucas (Chrysomelidae) and *Mylabris pustulata* Thunberg (Cantharidae). J. Animal Morphol. Physiol. 39:19–26.
- Aksu, E., 2018. Kahramanmaraş merkez ilçelerindeki koyunlarda demir, bakır ve çinko seviyelerinin araştırılması .Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa , Türkiye.
- Ashurst, D.E. and Richards, G., 1964. Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L., J. Morph., 114: 247- 254.
- Ashida, M., Brey, P.T. , 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 , 10698.
- Ashida, M., Brey, P.T, 1998. In: P. Brey, D. Hultmark (Eds.), Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects, Chapman and Hall, New York, pp. 135–172.
- Azambuja, P.D., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., 1991. Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. Mem.de Insitit. Oswaldo Cruz 86, 1–10.
- 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. Environ. Pollut. 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.
- Bertini, I., Gray, H.B., Lippard, S.J., Valentine, J.S., 1994. Bioinorganic chemistry, University Science Books. (<http://resolver.caltech.edu/CaltechBOOK:1994.002>).
- Bidochka, M.J., St Leger, R.J., Roberts, D.W., 1997. J. Invertebr. Pathol. 70: 184.
- Bohn, H., Barwig, B., 1984. Hemolymph Clotting in the Cockroach *Leucophaea maderae* (Blattaria). Influence of Ions and Inhibitors; Isolation of the Plasma Coagulogen. Comparative Physiology Part B, 154:457-467.
- Borowska, J., Pyza, E., 2011. Effects of heavy metals on insect immunocompetent cells. Journal of Insect Physiology, 57 : 760–770.
- 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.
- Brehelin, M. and 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.
- Brey, P.T., Lee, W-J, Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S. 1993. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasions and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6275-6279.

- Bronksil, J.F., 1961. A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). Journal of Lepidopteran Society, 102-104.
- Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K., 2013. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4:7, 597-603.
- Burke, R.D. 1999. Invertebrate Integrins: structure, function, and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 191:257-284.
- Butt, T.M., Shields, K.S., 1996. The structure and behavior of gypsy moth (*Lymantria dispar*) hemocytes. *J. Invert. Pathol.* 68, 1–14.
- Büßelberg, D., and 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. *Immunol. Rev.*, 198: 116–126.
- Chapman, R. F. 1998. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Choi, W.C., Seo, H.D., Yuk, E.J., Yun, Y.C., 2006. Comparison between hemolymph and tissue ferritin in response to heavy metal feeding in the wax moth *Galleria mellonella*. *Entomological Research*, 36, 155–161.
- Chouhan, S., Verma, S.C., and Thakur, M., 2017. Effect of Cadmium on Biology of Tobacco Caterpillar *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Nature Environment and Pollution Technology*, Vol. 16 (3): 883-888.
- Coleman, J.E., 1992. Zinc proteins: Enzymes, storage, proteins, transcription factors and modification proteins. *Annu Rev Biochem*, 61:897– 946.
- de Silva, C., Dunphy, G.B., Rau, M.E., 2000a. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Dev. Compar. Immunol.* 24, 367–379.
- Dow, J.A., 2017. The essential roles of metal ions in insect homeostasis and physiology. *Current Opinion in Insect Science*, 23:43–50.

- Dubovskiy, I.M., Grizanova, E.V., Ershova, N.S., Rantala, M.J. and Glupov, V.V., 2011. The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*, *Chemosphere*, 85: 92-96.
- Dubovskiy, I.M., Yaroslavtseva, O.N., Kryukov, V.Y., Benkovskaya, G.V., Glupov, V.V., 2013. An Increase in the Immune System Activity of the Wax Moth *Galleria mellonella* and of the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* under Effect of Organophosphorus Insecticide. *Comparative and Ontogenic Physiology*, 49(6): 592-596.
- Dubovskiy I. M., Kryukova N. A., Glupov V. V., Ratcliffe N. A. (2016) Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 13, 229-246.
- Dunn, P.E. Bohnert, T. and Russell. V.W. 1994. Midgut antibacterial defenses of *Manduca sexta* following infection and during metamorphosis. In: *Phylogenetic Perspectives in Immunology: The Insect Host Defense*, eds. Hoffmann, J.A. Janeway, C.A. Jr. and Natori, S. R.G. Landes Company, Austin. pp. 105-111.
- Er, A., Keskin, M., 2016. Influence of abscisic acid on the biology and hemocytes of the model insect *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 19(2): 244-251.
- Fenoglio, C., Bernardini, P., Gervaso, M.V., 1993. Cytochemical characterization of the hemocytes of *Leucophaea maderae* (Dictyoptera: Blaberoidea). *J. Morphol.* 218, 115–126.
- Florea, A.M., Dopp, E., Obe, G., Rettenmeier, A.W., 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 ,A.M., 2005. Toxicity of Alkylated Derivatives of Arsenic, Antimony and Tin: Cellular Uptake, Cytotoxicity, Genotoxic Effects, Perturbation of Ca²⁺ Homeostasis and Cell Death. Aachen: Shaker Verlag.
- Gagnon,A., Jumarie,C., Hontela,A., 2006. Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology ,78 :59–65.
- Garcia-Lara, J., Needham, A.J. and Foster, S.J. 2005. Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 43:311-323.
- Ghasemi, V., Moharramipor, S., Sendi, J.J. 2014. Impact of Pyriproxyfen and Methoxyfenozide on Hemocytes of the Mediterranean Flour Moth, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Crop Protection, 3(4):449-458.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R. and Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42: 611-643.
- Giulianini, P.G., Bertolo, E., Battistella, S., Amirante, G.A., 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae):involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis.Tissue Cell 35, 243–251.
- Götz, P. and Boman, H.G. 1985. Insect immunity. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, vol. 3, eds. Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. Pergamon Press, Oxford, pp. 453-485.
- Gupta, AP.,1979. Insect hemocytes development, forms, functions and techniques. New York: Cambridge University Press.
- Gupta, A.P. 1985. Cellular elements in hemolymph. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, vol. 3, eds. Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. Pergamon Press, Oxford, pp. 401-451.

- Gupta, A.P. 1991. Insect immunocytes and other hemocytes: role in cellular and humeral immunity. In: Immunology of Insects and other Arthropods, ed. Gupta, A.P. CRC Press. Boca Raton. pp. 19-118.
- Gupta V. Mammalian Feces as Bio-Indicator of Heavy Metal Contamination in Bikaner Zoological Garden, Rajasthan, India. Research Journal Animal, Veterinary and Fishery Sci. 2013; 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.
- Hawkes, J.S., 1997. Heavy metals, Journal of . Chemical Education, 74 (11) : 1374.
- Hernandez, S., Lanz, H., Rodriguez, M.H., Torres, J.A., Martinez, P.A., Tsutsumi, V., 1999. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. J. Med. Entomol. 36, 426–434.
- Hetru, C., Hoffmann, D. and Bulet, P. 1998. Antimicrobial peptides from insects. In: Molecular mechanisms of immune responses in insects, eds. Brey, P.T. and Hultmark D. Chapman and Hall, 1998. p. 40-66.
- Hillyer, J.F., 2016. Insect Immunology and Hematopoiesis. Developmental and Comparative Immunology, 58:102-118.
- Hoffmann, J.A., Janeway, C.A. Jr., and Natori, S. 1994. Phylogenetic Perspectives in Immunology: The Insect Host Defense. R.G. Landes Company, Austin.
- Huang, F., Yang, Y.Y., Shi, M., Li, J.Y., Chen, Z.Q., Chen, F.S., Chen, X.X., 2010. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Plutella xylostella* larva: cell types and their role in phagocytosis. Tissue Cell 42, 360–364.
- Huang, D., Kong, J., Seng, Y., 2012. Effects of the heavy metal Cu⁺² on growth, development, and population dynamics of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol, 105: 288-294.

- İstanbulluoğlu, H., 2011. Piyasada satılan süt ve süt ürünlerinde ağır metal kirliliği (Uzmanlık tezi). Ankara, Gülhane Askeri Tıp Akademisi.
- Jones, J.C., 1962. Current Concepts Concerning Insect Hemocytes. *American Zoology*, 2:209-246.
- Joshi, P.A., Lambdin, P.L., 1996. The ultrastructure of hemocytes in *Dactylopius confusus* (Cockerell), and the role of granulocytes in the synthesis of cochineal dye. *Protoplasma* 192, 199–216.
- Kafel, A., Rozpędek, K., Szulińska, E., Zawisza-Raszka, A., Migula, P., 2014. The effects of cadmium or zinc multigenerational exposure on metal tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 21:4705–4715.
- Kanost, M.R., Jiang, H., Yu, X.Q., 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.*, 198: 97–105.
- Koh, J.H., 2001. Zinc and disease of the brain. *Mol Neurobiol*, 24:99–106.
- Kwadha, C.A., Ong'amo, G.O., Ndegwa, P.N., Raina, S.K., and Fombong, A.T., 2017. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8, 61.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., Meister, M., 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 230, 243–257.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2001. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudauglia inclusens*. *J. Insect Physiol*, 47: 965-974.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295–1309.
- Lee, W-J, and Brey, P.T. 1995. Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*. *Gene* 161:199-203.

- 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 Tissue Res.* 320, 535–543.
- Ling E, Yu XQ, 2006. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 289-299.
- Luckhart, S., Cupp, M.S., Cupp, E.W., 1992. Morphological and functional classification of the hemocytes of adult female *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *J. Med. Entomol.* 29, 457–466.
- Mastore ,M., Binda, R.S., Giovannardi, S., Scari, G., Brivio, M.F. ,2015b. Inducible factors with antimicrobial activity after immune challenge in the haemolymph of Red Palm Weevil (Insecta). *Innate Immun.*, 21: 392–405.
- McFarlane, J., 1974. The functions of copper in the house cricket and the relation of copper to vitamin E. *Can. Entomol.* 106 (4): 441–446.
- Nappi, A.J., Ottaviani, E. ,2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, 22: 469–480.
- Nappi, A., Poirié, M., Carton, Y., 2009. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Adv. Parasitol.*, 70: 99- 121.
- Nation, J. L. (2002), *Insect Physiology and Biochemistry*, CRC press, Boca Raton, London, Newyork, Washington, D.C. 68-75.
- 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. *J. Apic. Res.* 53, 576–589.

- Neuwirth, M., 1973. The Structure of the Hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) . J. MORPH., 139: 105-124.
- Nielsen, R.A.; Brister, C., 1979. Greater wax moth: Behavior of larvae. *Annals of the Entomological Society of America* , 72: 811–815.
- Özbolat, G., Tuli, A., 2016. Ağır Metal Toksisitesinin İnsan Sağlığına Etkileri . Arşiv Kaynak Tarama Dergisi ;25(4):502-521.
- Pandey, R., Dwivedi, M.K., Singh, P.K., Patel, B., Pandey, S., Patel, B., Patel, A., and Singh, B., 2016. Effluences of Heavy Metals, Way of Exposure and Bio-toxic Impacts: An Update. *Journal of Chemistry and Chemical Sciences*, Vol.6(5): 458-475.
- Pech, L.L., Strand, M.R., 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J Cell Sci*;109:2053-60; PMID:8856501.
- Qiang, X., Hongxia, S., Xinjun, H., Yinghua, S., Dexiang, G., and Guren, Z., 2005. Apoptosis of *Spodoptera litura* larval hemocytes induced by heavy metal zinc. *Chinese Science Bulletin*, Vol. 50 : 2856—2860.
- Ratcliffe, N.A. and Gagen, S.J. 1977. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell* 9:73-85.
- Ribeiro, C., Brehelin, M., 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? *J. Insect Physiol.* 52, 417–429.
- Richards, E.H. ve Parkinson, N.M., (2000). Venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* adversely affects the morphology, viability, and immune function of hemocytes from larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 76: 33-42.
- Rosales, C., 2011. Phagocytosis, a cellular immune response in insects. *ISJ*, 8: 109-131.
- Russell, V.W. and Dunn, P. E. 1996. Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *J. Insect Physiol.* 42:65-72.

- Sadhu, S.D., Garg, M., Kumar, A., 2018. Major Environmental Issues and New Materials. New Polymer Nanocomposites for Environmental Remediation, s. 77-97.
- Schmidt, O., Theopold, U., Strand, M.R., 2001. Innate immunity and evasion by insect parasitoids. *BioEssays* 23, 344–351.
- 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*, Vol.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). *ISJ*, 15: 158-168.
- Sezer, B., Ozalp, P., 2015a. Effects of Pyriproxyfen on Hemocyte Count and Morphology of *Galleria mellonella*. *Fresenius Environmental Bulletin*. 24(2a):621-625.
- Shen, D., Li, M., Chu, Y., Lang, M., and An, C., 2016. Cellular immune response of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae), to infection by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *European Journal Of Entomology*, 113: 415–422.
- Silva, J. E. B., Boleli, I. C. And Simões, Z. L. P. 2002. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Braz. J. Biol.*, 62:689-699.
- Soares, T., Cavalcanti, M.G.D., Ferreira, F.R.B., Cavalcanti, M.D.D., Alves, L.C., Brayner, F.A., Paiva, P.M.G., 2013. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Lasiadora* sp. (Koch, 1850) (Araneae: Theraphosidae). *Micron* 48, 11–16.
- Sonawane, Y.S., More, N.K., 1993. The circulating hemocytes of the bed bug, *Cimex rotundatus* (Sign.) (Heteroptera: Cimicidae). *J. Animal Morphol. Physiol.* 40, 79–86.

- Strand, M.R., Pech, L.L., 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 31–56.
- Strand, M. R., Beck, M. H., and Lavine, M. D. (2006). *Microplitis demolitor* bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. *Arch. Insect Bich. Physiol.* 61, 134–145.
- Strand, M.R., 2008. The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 15: 1–14.
- Suganya , M., Karthi, S., and Shivakumar, M.S., 2016. Effect of Cd and Lead Exposure on Tissue Specific Antioxidant Response in *Spodoptera litura* Free Radicals and Antioxidants, Vol.6: 90-100.
- Sun, H.X., Dang, Z., Xia, Q., Tang, W.C., Zhang, G.R., 2011. The effect of dietary nickel on the immune responses of *Spodoptera litura* Fabricius larvae. *Journal of Insect Physiology*, 57, 954–961.
- Symon, C., Hutton, M., 1986. The quantities of cadmium, lead, mercury and arsenic entering the U.K. environment from human activities. *Science Of The Total Environment*, 57: 129–150.
- 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*. *J. Insect Physiol.* 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. J. Biol. Sci.* 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.
- Theopold ,U., Li D., Fabbri, M., Scherfer, C., Schmidt, O., 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 363-372.
- Theopold, U., Schmidt, O., Soderhall, K., Dushay, M.S., 2004. Coagulation in Arthropods, Defence, Wound Closure and Healing. *Trends in Immunology*, 25:289-294.

- Tsai, C.J.N., Loh ,J.M.S., Proft,T.,2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7:3, 214-229.
- Tunaz, H., 2004. Böceklerde Bağışıklık Mekanizması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 7(2), 78-82.
- Vilmos, P., Kurucz, E. ,1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*, 62, 59-66.
- 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.
- Wojda, I., 2017. Immunity of The Greater Wax Moth *Galleria mellonella*. *Insect Science*, 24:342-357.
- Wu, G., Yi, Y., 2015. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemical 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.
- Yılmaz, E. (2013) Farklı dozlardaki Alüminyum Klorür'ün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Biyolojisine ve Hemositlerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2010 yılında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümüne yatay geçiş yaptı. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi’nde lisans eğitimini tamamlayarak mezun oldu. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

