

T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Fe₂O₃ NANOPARTİKÜLÜNÜN BÜYÜK BAL MUMU GÜVESİ *Galleria mellonella*
ENZİM SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET SERTBAŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA COŞKUN

ADYAMAN, 2022

ÖZET

Fe₂O₃ NANOPARTİKÜLÜNÜN BÜYÜK BAL MUMU GÜVESİ *Galleria mellonella* ENZİM SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Mehmet SERTBAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Adıyaman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ağustos 2022

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa COŞKUN

Yapılan çalışma force-feeding yöntemiyle 7. evre *G. mellonella* larvalarına verilen Fe₂O₃ (1, 2, 5, 10, 20, 50 µg/larva) nanopartiküllerinin karbohidrat, protein, lipid miktarı ve oksidatif stres belirteçleri (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), melondialdehit (MDA)) üzerine etkisi spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir.

Protein miktarında 4 saat sonunda en yüksek dozda düşüş görülmesine rağmen ve 24 saat sonunda en yüksek düşüş 1.00 µg/Larva dozunda görülmüştür. Lipid miktarını düzeyine bakıldığında 4 saat sonunda 1.00 µg/Larva dozu dışında diğer dozlarda düşüş görülmüş ve 24 saat sonunda bütün dozlarda düşüş kaydedilmiştir. Karbohidrat miktarında 4 saat ve 24 saat sonunda kontrol besine göre düşüş olduğu gözlenmiştir. SOD enzim aktitesinde 4 saat sonunda en yüksek dozda en yüksek artış görülmesine rağmen 24 saat sonunda en fazla düşüş en yüksek dozda görülmüştür. CAT aktivitesinde 4 saat sonunda 5.00, 20.00, 50.00 00 µg/Larva dozları kontrol grubuna göre düşüş görülmüş ve 24 saat sonunda 1.00 µg/Larva hariç diğer dozlarda düşüş görülmüştür. Oksidatif stres biyobelirteçlerinden biri olan MDA miktarında 4saat sonunda kontrole göre artış göstermiş ve 24 saat sonunda ise kontrole göre 10.00,20.00 ve 50.00 µg/Larva dozlarında artış gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada demir oksidin doz ve süreye bağlı olarak biyokimyasal parametreler üzerine farklı etkilere neden olabileceği model böcek *G. mellonella* kullanılarak gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*, Protein, Demiroksit, Antioksidan enzimler,

ABSTRACT

THE EFFECT OF Fe₂O₃ NANOPARTICLE ON ENZYME SYSTEM OF THE GREATER WAX MOTH *Galleria mellonella* LARVEA.

Mehmet SERTBAŞ

Department of Biyology

Adiyaman University Graduate Education, Agust,2022

Department of Biyology

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa COŞKUN

In this work carried out, the effect of Fe₂O₃ (1, 2, 5, 10, 20, 50 µg/larva) nanoparticles given to stage 7th *G. mellonella* larvae by force-feeding method on carbohydrate, protein, lipid amount and oxidative stress markers (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), melondialdehyde (MDA)) was determined by spectrophotometric method.

The highest drop in protein quantity was 1.00 µg/Larva after 24 hours, despite the highest drop in the highest dose after 4 hours. Based on the level of the lipid amount, other doses were dropped outside of the dose of 1.00 µg/Larva after 4 hours and all doses were recorded after 24 hours. In the amount of carbohydrates, it was observed that there was a decrease in control five after 4 hours and 24 hours. Although the highest dose of the highest increase in the SOD enzyme flow after 4 hours, the maximum drop after 24 hours has been seen in the highest dose. CAT activity has decreased by control group of 5.00, 20.00, 50.00 µg/Larva doses after 4 hours, and other doses, except 1.00 µg/Larva, were seen at the end of 24 hours. An increase in the amount of MDA, one of the oxidative stress biomarkers, increased by control at the end of 4 hours, and an increase in the doses of 10.00,20.00 and 50.00 µg/Larva was observed at the end of 24 hours.

As a result, in this study where iron oxide can have different effects on biochemical parameters depending on the dose and time shown using the model insect *G. mellonella*.

Keywords: *Galleria mellonella*, Protein, Ironoxide, Antioxidan enyzmes

TEŞEKKÜR

Ciddi bir emek ve özveri ile hazırladığım yüksek lisans tezimi tamamlamanın heyecanını yaşıyorum. Bu bölümü benden desteklerini esirgemeyen ve beni teşvik eden insanlara ayırıp teşekkür etmeyi borç bilirim.

Öncelikle danışmanlığımı üstlenen, konu seçiminden araştırmanın yürütülmesine dek beni sınırlamayıp özgür bırakan, yüksek lisans öğrencisinin yeterliliğini göstermesine olanak tanıyan ve birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa COŞKUN'a ve her zaman kapısını rahatlıkla çalabildiğim hocam Sayın Doç. Dr. Tamer KAYIŞ'a engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyip beni destekledikleri için teşekkür ederim.

Bu süreçte kansere yakalanan ve özellikle de deney çalışmalarım sürecinde çok ihmal edip, yanında olamadığım, tezimi yazdığım dönemde de kaybettiğim babam Ali SERTBAŞ'ı rahmetle anarak teşekkürü borç bilirim. Sadece bu süreçte değil hayatımın her evresinde her zaman yanımda olan, gecelerce benimle beraber uyumayıp desteğini esirgemeyen ve daima yüreklendiren can yoldaşım Evrim SERTBAŞ'a teşekkür ederim.

..../...../2022

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Adıyaman Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Mehmet SERTBAŞ

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	I
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
GÖRSELLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Galleria mellonella</i> Biyolojisi	3
1.2. Enzimler	5
1.2.1. Süperoksidaz dismutaz (SOD)	6
1.2.2. Katalaz (CAT)	6
1.2.3. Malondialdehit (MDA)	7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1 <i>G. mellonella</i> 'nın elde edilmesi.....	10
3.1.2. Deney besinlerin hazırlanması ve böceklerle uygulanması.....	10
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Karbohidrat ve lipid miktarı tayini için böceklerin homojenizasyonu.....	12
3.2.2. Karbohidrat miktarı tayini	12
3.2.3. Lipid miktarı tayini.....	13
3.2.4. Böcek homojenizasyonu.....	15
3.2.5. Protein düzeyi tayini	15
3.2.6. Malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi.....	16

3.2.7. Süperoksit dismutaz (SOD) aktive tayini.....	17
3.2.8. Katalaz (CAT) aktivite tayini.....	18
3.3. Verilerin istatistiksel analizi	19
4.BULGULAR	20
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ	45



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4.1. Demir oksit Nanopartiküllerinin <i>G. mellonella</i> larvalarının SOD, CAT aktivitelerine ve MDA miktarlarına 4 saat sonundaki etkileri.....	20
Tablo 4.2. Demir oksit Nanopartiküllerinin <i>G. mellonella</i> larvalarının SOD, CAT aktivitelerine ve MDA miktarlarına 24 saat sonundaki etkileri	23
Tablo 4.3. Demir oksit Nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarının protein, karbohidrat ve lipid miktarlarına 4 saat sonundaki etkileri.....	26
Tablo 4.4. Demir oksit Nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarının protein, karbohidrat ve lipid miktarlarına 24 saat sonundaki etkileri.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Nanoteknolojinin kullanım alanları.....	1
Şekil 1.2. Demir oksit nanopartikülünün kafes yapıları.....	2
Şekil 4.1. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında SOD aktivitesi üzerine 4 saat sonunda etkisi.....	21
Şekil 4.2. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında CAT aktivitesi üzerine 4 saat sonunda etkisi.....	21
Şekil 4.3. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında MDA aktivitesi üzerine 4 saat sonunda etkisi.....	22
Şekil 4.4. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında SOD aktivitesi üzerine 24 saat sonunda etkisi.....	24
Şekil 4.5. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında CAT aktivitesi üzerine 24 saat sonunda etkisi.....	24
Şekil.4.6. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında MDA aktivitesi üzerine 24 saat sonunda etkisi.....	25
Şekil.4.7. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında protein miktarı üzerine 4 saat sonunda etkisi.....	26
Şekil.4.8. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında karbohidrat miktarı üzerine 4 saat sonunda etkisi.....	27
Şekil.4.9. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında lipid miktarı üzerine 4 saat sonunda etkisi.....	28
Şekil.4.10. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında protein miktarı üzerine 24 saat sonunda etkisi.....	30
Şekil.4.11. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında karbohidrat miktarı üzerine 24 saat sonunda etkisi.....	30
Şekil.4.12. Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> larvalarında lipid miktarı üzerine 24 saat sonunda etkisi.....	31

GÖRSELLER DİZİNİ

Görsel 3.1. <i>G. mellonella</i> kültürü	10
Görsel 3.2. Fe ₂ O ₃ Nanopartikülünün hazırlanışı	11
Görsel 3.3. Fe ₂ O ₃ Nanopartikülünün <i>G. mellonella</i> 'ya uygulanması.....	11
Görsel 3.4. Karbohidrat analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi.....	13
Görsel 3.5. Lipid analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi	14



SİMGELER VE KISALTMALAR

g	: Gram
L	: Litre
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
ALB	: Albümin
APOX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
C ₆ H ₈ O ₆	: Askorbik asit
C ₁₄ H ₁₀ O	: Antron
CuCl ₂ .2H ₂ O	: Bakır klorür
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır sülfat
C ₂ H ₅ OH	: Etil Alkol
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CHCl ₃	: Kloroform
CH ₃ OH	: Metanol
C ₈ H ₈ O ₃	: Vanilin
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
Fe	: Demir
Fe ₂ O	: Demir oksit (Wüstit)
Fe ₂ O ₃	: Demir oksit (Magnetit)
Fe ₃ O ₄	: Demir oksit (Manyetit)
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
K ₂ HPO ₄	: Potasyum fosfat
KCl	: Potasyum klorür

K_2HPO_4	: Di-Potasyum hidrojen fosfat
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
LPO	: Lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehid
Na_2SO_4	: Sodyum sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
NBT	: Nitrotetrazoliumbluechloride
NaOH	: Sodyum hidroksit
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
NaCl	: Sodyum klorür
$(NH_4)_2SO_4$	: Amonyum sülfat
NM	: Nanomateryal
NP	: Nanopartikül
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
OS	: Oksidatif stres
O_2^-	: Süperoksit anyonu
OH	: Hidroksil radikali
TCA	: Trikloroasetik asit
TBA	: Tiyoarbiturik asit

1. GİRİŞ

Bilim ve teknolojinin gelişmesi ile beraber her geçen gün yeni bir araştırma alanı oluşmaktadır. Nanoteknoloji de günümüzde önemli bir yere sahip olup araştırma ve geliştirme için önemli yatırımların yapıldığı bir alandır. “Nano” “bodur (küçük)” anlamına gelen Yunanca’dan türetilmiş bir kelimedir; yani küçük parçacıkların teknolojisi de diyebiliriz[1]. 1 nanometre “nm” ile ifade edilir ve 1 metrenin milyarda biri (10^{-9} m) ölçüsündedir [2]. Bazı araştırmacılar 50 nm kadar olan maddeleri nanopartikül olarak sınıflandırırken [3] bazı araştırmacılar ise 100 nanometre ve 1 mikronu (μ)[1] üst sınır olarak kabul ederek sınıflandırmaktadır. Nanoparçacıklar daha düşük hata seviyeleri ve eşsiz dayanıklılık güçleri ile halihazırdaki birçok endüstriyel süreç için devrimsel yenilikler getirmektedir. Aktif ve çok yönlü formlardaki nanoparçacıkların oluşması veya oluşturulmasıyla birlikte biyoloji, tıp, eczacılık, kozmetik, matematik, fizik, kimya, elektronik, tarım ilaçları, bilişim, otomobil gibi birçok alanda kullanımı yaygındır[4].



Şekil 1.1. Nanoteknolojinin kullanım alanları[5].

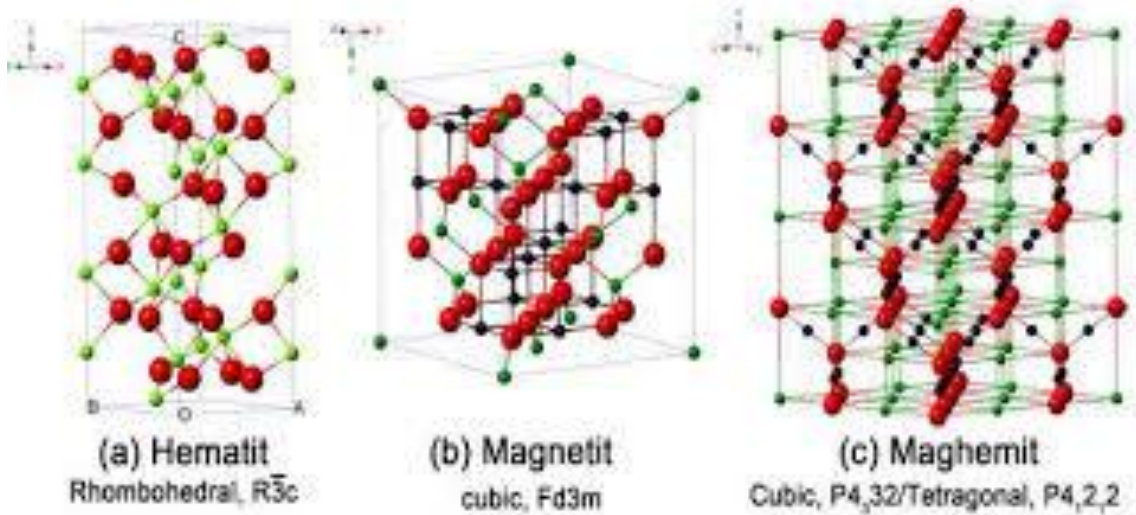
Nanopartiküller doğal kaynaklı veya insan kaynaklı nanopartikül olabilmektedir. Örneğin toz fırtınaları, okyanus suyunun buharlaşması, volkanik patlamalar ve orman

yangınları doğal kaynaklı olabilirken kozmetik ürünler evsel atıklar sigara dumanı egzoz ve bina yıkıntıları insan kaynaklı nanopartiküller olabilmektedir[1].

Nanopartiküller genel olarak karbon bazlı nanopartiküller, yarı iletken bazlı nanopartiküller ve metal bazlı nanopartiküller olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca nanopartiküller şekillerine göre: yüzey modifikasyonu, kimyasal doğası, dağılma ortamı gibi farklı özellikler gözönünde bulundurularak da sınıflandırılabilir[6].

Metal bazlı nanopartiküllere bakır, altın, gümüş, platin, demir, titanyum gibi örnekler verilebilmektedir. Farklı formlarda bulunan magnezyum, bakır, gümüş, demir, altın, platin gibi metal bazlı nanoparçacıklar saf haldeyken; çinko oksit, magnezyum oksit, alüminyum oksit, demir oksit gibi metal oksit formlarında da bulunabilmektedir. Metal oksit nanoparçacıkları doğada kendileri oluşabildikleri gibi bunların sentezi de yapılabilmektedir[7].

Demir oksit, farklı kimyasal bileşen ve manyetik özelliklere sahip metal oksittir. Demir oksitin birçok formu olmakla birlikte en önemlileri Fe_xO (wüstit) Fe_2O_3 (maghemit), Fe_3O_4 (manyetit)tir. Fe_2O_3 ve Fe_3O_4 en çok kullanılan demir oksitlerdir. Fiziksel özellikleri aynı olan maghemit ve manyetit mıknatıslık özelliği daha az olan maghemittir. Paramanyetik olan Fe_2O_3 kırmızımsı kahverengi rengine sahip inorganik bir bileşiktir[8].



Şekil 1.2. α - Fe_2O_3 (hematit), Fe_3O_4 (manyetit), γ - Fe_2O_3 (maghemit) kafes yapıları[9].

Demir oksitler manyetik özelliklerinden dolayı araçlar, ferro sıvılar, katalizörler, sağlık alanında görüntüleme cihazlarında ve farmasötik gibi uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Protein saflaştırılmasında, sulardaki ağır metallerin eliminesinde, besinlerin analizinde ve ilaç taşıyıcı olarak da kullanılabilir. Fe_2O_3 ve Fe_3O_4 nanoparçacıklarının sentetik metodlarla oluşturulması için literatürlerde birçok farklı yöntem yer almaktadır[10,11].

Demir oksit nanoparçacıkları biyolojik, kimyasal ve fiziksel olarak farklı yöntemlere göre üretilir. Bu yöntemler partikülün kararlılığı ve yapısı biyolojik uyum için oldukça önemlidir. Bunların sentezi için en çok hidrotermal, sanokimyasal sentez, mikroemülsiyon, birlikte çöktürme ve elektrokimyasal biriktirme metodları kullanılır. Bu metodlar demir oksit parçacıklarını daha verimli elde etmek için kullanılır. Bu metodlarla birlikte mikroorganizma veya bakteriyel sentez ve lazer piroliz teknikleri de kullanılır[8,12-17].

1.1. *Galleria mellonella* Biyolojisi

Alem	: Animalia
Şube	: Arthropoda
Sınıf	: Insecta
Takım	: Lepidoptera
Üst Familya	: Pyraloidea
Familya	: Pyralidae
Alt Familya	: Gallerinae
Cins	: <i>Galleria</i> (Fabricius, 1798)
Tür	: <i>Galleria mellonella</i> (Linnaeus, 1758) [18]

Büyük bal mumu güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* (L.) Lepidoptera takımının Pyralidae familyasına ait ılıman bölgeleri seven holometabol olan bir tür böcektir[21]. Yapılan bazı araştırmalara göre dünya genelinde yaygın olarak yaşayan bal mumu güvesinin arıcılığın yoğun olduğu bölgelerde daha fazla yayılım gösterdiği bilinmektedir, ayrıca bu canlının adaptasyon yeteneği oldukça yüksektir[19,20]. *G. mellonella* larval evrede petek, bal ve bal mumu ile beslenmektedir. Bu nedenle bal mumu güvelerinin arıcılık sektöründe önemli ölçüde kayıplara neden olduğu bilinmektedir[22]. *G. mellonella* ergin evrede ise besin tüketmemektedir. Etkili bir mücadele için böceğin biyokimyası ve fizyolojik yapısının anlaşılabilmesi için son yıllarda büyük bal mumu güvesi ile ilgili çalışmalar oldukça artmıştır[22,23]. *G. mellonella*'nın laboratuvar ortamında çok fazla yumurta vermesi, gelişim döngüsünün kısa olması, besinin az maliyetli olup kolay hazırlanmasıyla birlikte memelilere bağışıklık sistemi, hücre yapısı, ve metabolik olarak benzediğinden daha çok tercih edilen bir model organizma olmuştur. Bununla birlikte farmakolojik çalışmalarda ilaç deneylerinde, mikroorganizmaların patojenik çalışmalarında kullanılabilmektedir. *G. mellonella*'nın 30 ± 2 °C ve 65 ± 5 bağıl neme bağlı olarak gelişim döngüsü 3 - 5 ay arası sürmektedir. Yaşam döngüsü; 7-11 gün arası larvalar yumurtadan çıkmakta ve yumurtaları ise beyazımtırak veya krem renginde olup küre şeklindedir. Larval evre 14-28 gün sürmektedir. Yumurtadan çıkan larvalar kül renkli ya da krem renkli olabilmektedir. Larvalar segmentli bir yapıya sahip olup büyüdükçe segmentler belirginleşir ve renkleri gün geçtikçe koyulaşır. Larval evrede peteklerin tahribasyonu üst düzey iken diğer evrelerde yok denilecek kadar azdır. *G. mellonella*'nın larval dönemi 7 evreden oluşmaktadır ve son evre olan 7. evrede koza örüp pupa dönemine geçmeye çalışır. 8-15 gün olan pupal evrede örmüş olduğu koza nedeniyle beyazımsı renkli olmakla birlikte kozanın içindeki pupa ise koyu sarımsı-turuncu renkli olup ve evrenin sonuna doğru pupa koyulaşır. Ömürleri 10-25 gündür, ergin bireyler dişi ve erkek olmak üzere farklı cinsiyetlere sahiptir. Dişi bireyler erkek bireylere göre daha iri ve daha koyu renklidir. Ergin bireyler yaşam süreleri boyunca yaklaşık 250-650 arası yumurta bırakmaktadır[21,24].

1.2. Enzimler

Canlı metabolizması, toksik faktörlere karşı direnç sağlamak için kendi savunma sistemini kullanır. Bu sistemler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılır. Canlının metabolik olaylara karşı oluşturduğu bu karmaşık olan antioksidan sistemleri savunmada görev alır. Canlı, bu savunma sistemlerini biyotik ve abiyotik faktörlerde bulunan serbest radikallere karşı kullanıp yaşam süresini arttırmak için geliştirir[25,26,27,28]. Hücreler metabolik olaylar sonucu sürekli olarak reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturur ve bu reaktif oksijen türleri ile denge halindedir. Bu reaktif türlerini yok etmeye çalışan antioksidanlar görev almaktadır. Bu antioksidanlar metabolizma aktivite süresi boyunca üretilmektedir[29].

Serbest radikalleri durdurmaya çalışan ve oluşacak olan olası hasarları önlemek için kullanılan ana sistem, antioksidan savunma sistemidir. Radikalleri dengeleyen antioksidanlar ile serbest radikallerin denge durumunun bozulması protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitleri ve hücre zarının hasarına neden olabilmektedir[29-30].

Normal koşullarda hücrelerde antioksidanlar üretilmektedir ancak bununla birlikte dışarıdan da besinler yoluyla alınabilmektedir[30]. Serbest radikaller, yörüngelerinde en az bir eşleşmemiş elektron bulunduran atom, molekül veya bileşiklerdir. Bu radikaller sürekli diğer bileşik veya atomlarla etkileşime girmeye çalışarak kararlı hale geçme isteğine sahiptir[27,31,32]. Serbest radikallerin en temel kaynağı molekül yapıdaki oksijendir. Serbest radikaller güçlü oksidan özellikteki oksijen ara ürünlerinin olması için oksijenin indirgenmesini sağlar. Bu radikaller başka atom ve bileşik ajanlarla etkileşime girerek biyolojik etkilere neden olmaktadır[33]. Serbest radikallerin gerek metabolik olaylar gerekse çevresel faktörler ile (sigara, alkol, ilaç takviyesi, U.V. ışınları) üretilmesi her zaman devam etmektedir[34]. Canlıdaki antioksidan savunma sistemleri metabolizma faaliyetleri sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin eliminesinde yetersiz kaldığı durumlarda denge bozulur ve bu dengenin bozulması olayına oksidatif stres denir[35,36,37]. Oksidatif strese neden olan oksidasyon reaksiyonları hücredeki moleküllerin deforme olmasına, hücrelerin zarar görmesine hatta hücrenin ölümüne dahi neden olabilir[38]. Serbest radikal kaynaklarına alkol, sigara tüketimi, ağır metaller, fazla demir yüklemesi, ileri yaş faktörü, U.V. ışınları, doğum kontrol ilaçları ve radyasyon örnek verilebilir. Bununla birlikte askorbik asit, karotenoidler, glutatyon ve tiyoller,

flavonoidler, α -tokoferoller, selenyum, ubikinon, koenzim Q, serüloplazmin, albümin, bilirubin, melatonin, metiyonin, miyoglobin, ferritin, ürat, hemoglobin, transferrin, sistein ve APOX, CAT, GST, GPx, GR gibi enzimler de antioksidan moleküller olarak örneklendirilebilir. Oksidatif hasar biyobelirteçleri olarak da DNA hasarının belirlenmesi, protein hasarının belirlenmesi ve lipid peroksidasyon ürünlerinin belirlenmesinde kullanılabilir[27,39,40,41,42].

1.2.1. Süperoksidaz dismutaz (SOD)

Süperoksidaz dismutaz (SOD) oldukça zararlı olan süperoksit radikali anyonları ve ROS (reaktif oksijen türleri) karşı aktivitesi yüksek olan enzimdir[43]. Çok güçlü antioksidan olan SOD, hücrede tahribasyona yol açan süperoksit radikalini hidrojen peroksit (H_2O_2) ve O_2 'e (moleküler oksijen) dönüşümünü gerçekleştirerek uzaklaştırır. Hem indirgeyici hem de oksitleyici özelliğine sahip olan süperoksit radikali oksidan görevini üstlenerek bir e^- (elektron) alıp hidrojen peroksite indirgenir[44]. Gelişmiş canlılardan basit yapıli organizmalara kadar canlıların bütün hücre ve dokularında süperoksit dismutaz bulunmaktadır[45].

Bulunduğu yere göre;

Sitoplazmik SOD Cu-Zn-SOD (SOD1),

Mitokondriyal SOD Mn-SOD(SOD2),

Ekstraseller SOD Cu-SOD (SOD3) olmak üzere üç formu bulunur. Bu üç form da hücrede oluşan süperoksit radikallerine karşı iyi bir antioksidan enzimi olup hücreyi hasarlardan korumaktır ancak hücre içinde en çok bulunan sitoplazmik formudur[46].

1.2.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT) hayvanlarda metabolik aktivitesi yüksek olan kalp, kas, böbrek, karaciğer gibi organların hücrelerinde bulunup bu hücrelerin de endoplazmik retikulum, mitokondri ve peroksizomunda bulunur. Katalaz enziminin hücrede en çok bulunduğu

organel peroksizomlardır. Hemoprotein yapılı olan katalaz enzimi hücre içindeki metabolik olaylar sonucu oluşan H_2O_2 'i (hidrojen peroksit) H_2O (su) ve O_2 'ye(oksijen) parçalar[47].

1.2.3. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit, çoklu bağ içeren doymamış yağ asitleri peroksidasyonun en çok çalışanı ve en temel ürünüdür. Malondialdehit çoğunlukla oksidatif stres düzeyini ölçen bir belirteçtir. Metabolizma sonucu oluşan serbest radikaller, doymamış yağ asitleri ve kolesterol ile etkileşime girerek lipid peroksidasyonunu oluşturur. Malondialdehit, tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyona girdiğinden dolayı çoklu doymamış (Omega-3, Omega-6) yağ asitleri lipid peroksidasyonu için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır[46-50].

Hayatımızın her alanında nanopartiküller doğrudan veya dolaylı olarak canlıya nüfuz etmektedir. Kullanımı hızla yaygınlaşan nanopartiküller kozmetik sektöründe, besin analizlerinde, tıp, eczacılık gibi alanlarda kullanılır iken demir oksit nanopartikülleri daha çok kanser ilaçları, tarım, medikal uygulamaları gibi alanlarda kullanılmaktadır. Ağır metallerin canlı vücutuna alınmasıyla doku, organ hücrelerinde birikmektedir. Bu birikim ile birlikte organizma biyolojik ve kimyasal farklılıklar gösterebilmektedir. Fe_2O_3 nanopartikülünün organizmada nasıl bir etkiye sahip olduğu tam olarak bilinmemektedir. Model organizma olarak kullanılan büyük bal mumu güvesi kolay yetiştirilmesi, hızlı üreme döngüsü, düşük maliyetli olmasıyla birlikte immün sistemleri memeliler ile benzerlik gösterdiği için bir biyoindikatör olarak kullanılmıştır. Büyük bal mumu güvesi ile yapılan çalışmalarda oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir ancak *G. mellonella* 'da Fe_2O_3 nanopartiküllerinin antioksidan enzim sistemi üzerine etkilerinin araştırılması ile ilgili yeterli çalışmaya bulunmamaktadır. Bu bağlamda özenle yaptığımız çalışmada *G. mellonella* larvalarında force-feeding yöntemiyle verilen farklı konsantrasyonlardaki Fe_2O_3 nanopartikülünün antioksidan savunma sistemlerinden SOD, CAT enzimlerine etkileri, MDA miktarı, total karbohidrat, total protein ve total lipid miktarlarına nasıl etki ettiği araştırıldı.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Remya vd.[51]; Demir oksit nanopartiküllerinin Hint sazanı olan *Labeo rohita* 'daki bazı parametreler üzerindeki etkilerini incelemiştir. Deney sonunda balıklardan alınan kırmızı kan hücresi sayısında, hemotokritte önemli derecede artış olduğu, hemoglobin hacmi ve konsantrasyonunda, beyaz kan hücre sayılarında düşüş olduğu tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu demir oksit nanopartiküllerinin bu balıklarda fizyolojik olarak olumsuzluklar oluşturabileceği ifade edilmiştir.

Zhang vd.[52]; İki farklı formdaki demir oksit nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarda zebra balığına verilmesi ile vücuttaki birikimi, eliminasyonu araştırılmıştır. Demir oksit nanopartikülüne maruz bırakılan balıkların gövdesinde ve dışkısında yapılan ölçümler sonunda yüksek oranda nanopartikül birikimi olduğu tespit edilmiştir ancak temiz suya alınan balıkların nanopartikülleri büyük bir oranda atıldığı ölçülmüş ve nanopartiküllerin gastrointestinal ile elimine edildiği belirtilmiştir.

Ateş vd.[53]; Tilapia (*Oreochromis niloticus*)' nın alfa ve gama demir oksit nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılarak doku ve organlarda birikimi, atılımı hematolojisi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Balığın doku ve organlarında önemli derecede artan nanopartiküllerin tatlı sularda büyük bir kısmının elimine ettiği ve diğer parametrelerde önemli bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir.

Akbary vd.[54]; Makro ve nano demir oksiti farklı konsantrasyonlarda balık besininde katkı maddesi olarak kullanarak bazı parametreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Demir oksit takviyeli besinler ile beslenen balıklar diğer balıklara oranla büyüme hızı, histopatolojik, gen ekspresyonlarının düzeni ve enzimatik reaksiyonlarda olumlu etki gösterdiği ifade edilmiştir.

Ramalingam vd.[55]; Yumurtalık kanseri kadınların yakalanma olasılığının fazla, yaşama süresinin kısa olduğu ve sık rastlanan jinekolojik kanser türüdür. İn vitro demir oksitin kristal yapısı, düzensiz şekli hücrelerdeki mitokondri zarına zarar verdiği, reaktif oksijen türlerinde(ROS) artış gösterdiği metastaz hücrelerinin yok edildiği için yumurtalık kanserinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Thangandiyan vd.[56]; Demir oksit nanopartiküllerinin *Labeo rohita* 'daki aktivitesini incelemiştir. Kültür eklenen demir oksit nanopartiküllerinin *Labeo rohita* 'nın hayatta kalma, büyüme ve biyokimyasal bileşenler üzerine olumlu etkiler yaptığı, hemoglobin ve eritrosit değerlerini artırdığını tespit etmiştir. Elde edilen verilere göre demir oksit nanopartiküllerinin balığın demir eksikliğini gidermede ve büyümede alternatif bir besin kaynağı olabileceği ifade edilmiştir.

Tombuloğlu vd.[57]; Demir oksit nanopartiküllerin arpa üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda arpaya uygulanan demir oksit nanopartikülleri kök ve dokuları incelendikten sonra kökteki hücre zarının zarar gördüğü, klorofil ve karotenoidleri azalttığını, pigment sentezi ve çimlenmede engelleyici bir yapıya sahip olduğu ifade edilmiştir.

Eskin vd.[57]; Farklı konsantrasyondaki demir oksit nanopartikülleri force-feeding yöntemi ile 6.evre büyük bal mumu larvalarına uygulanmıştır. Yüksek konsantrasyondaki demir oksit nanopartiküllerinin uygulandığı larvalarda pupa ağırlığının önemli oranda arttığı ve bu konsantrasyonda ergin gelişim evresinin de arttığı ifade edilmiştir. Ancak kontrol gruplarına göre pupa gelişim zamanı, pupa ve ergin ağırlığı, ergin yaşam süresinde istatistiksel açıdan önemli bir fark oluşmadığı ifade edilmiştir.

Faria vd.[59]; Herbisit olan glifosat ve demir oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan *Poecilia reticulata* balığında karaciğer dokusundaki etkileri incelenmiştir. Kullanılan glifosat bazlı herbisitlerin dokulara zarar verdiği ve demir oksitin bu toksik maddeleri etkisizleştirme ve iyileştirmeye sahip olduğu ifade edilmiştir.

Gonçalves vd.[60]; Demir oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan erkek lepisdeslerin üremedeki aktivitelerini incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda verilen demir oksit nanopartiküllerin erkek lepisdeslerin üreme davranışlarında bir değişiklik olmamasıyla birlikte spermatogenezi değiştirdiği ifade edilmiştir.

Kohei.[61]; *Cyprinus carpio* balığını farklı konsantrasyonlu demir oksit ve FeCl₃'e maruz bırakılmıştır. Elde edilen deney guruplarında dokularda önemli miktarda nanopartikül artışı olduğu ve bağışıklık sistemindeki tepkinin azaldığı ifade edilmiştir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM**3.1. Materyal****3.1.1 *G. mellonella*'nın elde edilmesi**

Farklı konsantrasyonlara sahip demir oksit nanopartiküllerinin *G. mellonella* üzerindeki bazı biyoparametrelerine etkisi araştırıldı. Bu çalışmada kullanılacak olan *G. mellonella* bireyleri de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, % 65 ± 5 bağıl neme ve karanlık ortama sahip laboratuvar ortamında Broksill[62] tarafından geliştirilen besin ile beslenen stok larvalarından 7. evre larvaları kullanıldı.

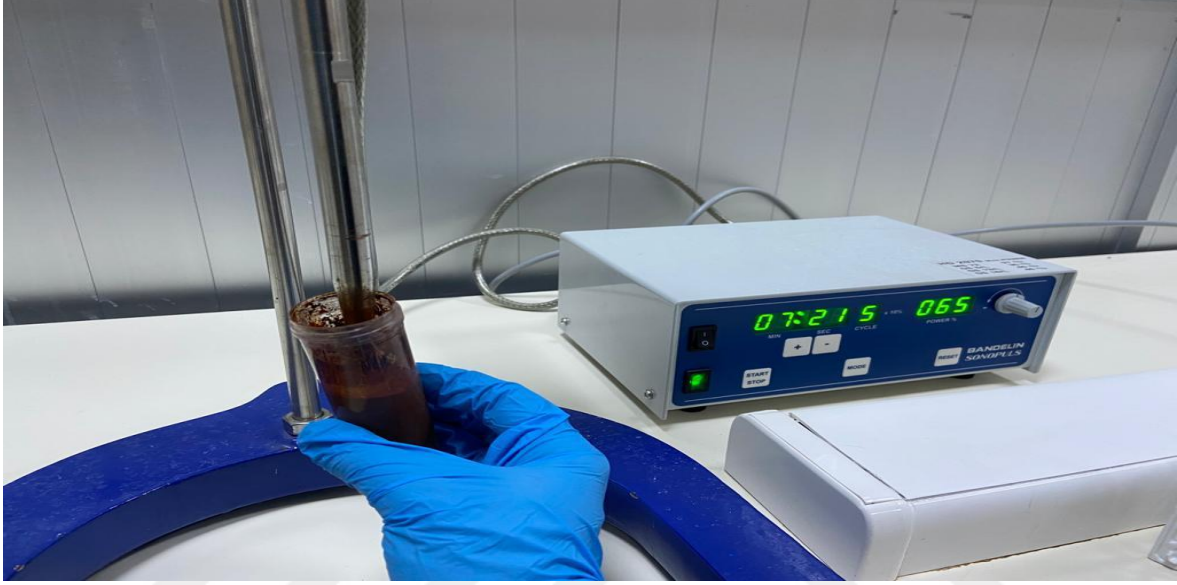


Görsel 3.1. *G. mellonella* kültürü

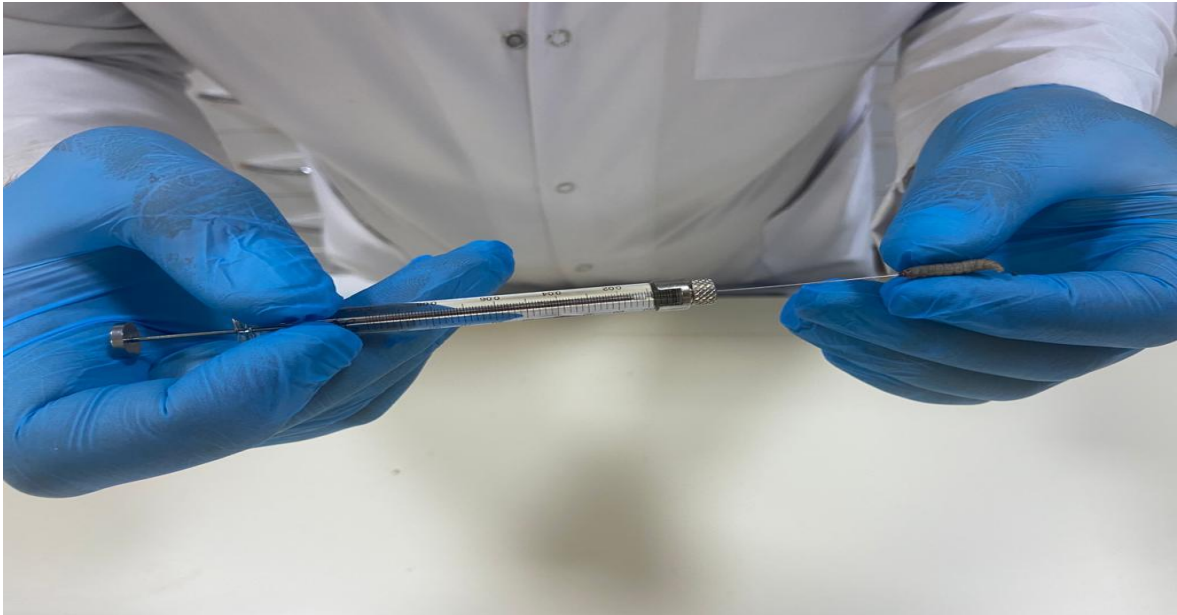
3.1.2. Deney besinlerin hazırlanması ve böceklere uygulanması

Bu çalışmada kullanılan besin, yapılan denemeler sonucunda 1, 2, 5, 10, 20, 50 μg dozları olarak belirlendi. Kullanılan demir oksit nanopartikülü bidistile su içinde homojenizatör cihazı yardımı ile konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyonlar 10 μl Hamilton marka enjektör yardımıyla alınıp force-feeding yöntemi ile 7. evre *G. mellonella* larvalarına verildi. Kontrol grubundaki larvalara işlem uygulanmadı ve negatif

kontrol için alınan larvalara 10 µg bidistile su verildi. Force-feeding yöntemi sonrasında larvalar 4 ve 24 saat boyunca % 65±5 bağıl nem 30±2°C sıcaklık ve karanlık ortama sahip laboratuvar ortamında bekletildi. Beklenen süre sonunda larvalar alınıp yaş ağırlığı belirlendikten sonra biyokimyasal analizler için -80°C’de saklandı. Her bir konsantrasyon için beş larva ve her bir konsantrasyon için beş tekrar şeklinde deney yapıldı.



Görsel 3.2. Fe₂O₃ Nanopartikülünün hazırlanışı



Görsel 3.3. Fe₂O₃ Nanopartikülünün *G. mellonella*'ya uygulanması

3.2. Yöntem

Farklı tozlarda demir oksit nanopartiküllerinin uygulandığı -80°C’de muhafaza edilen larvalar, karbohidrat miktarı, lipid miktarı, protein miktarı tayini, melondialdehit (MDA) ve enzim aktiviteleri çalışılmak üzere hazırlandı.

3.2.1. Karbohidrat ve lipid miktarı tayini için böceklerin homojenizasyonu

Karbohidrat ve lipid miktarı için önceden yaş ağırlıkları alınan -80°C’de muhafaza edilen *G. mellonella* larvaları kullanıldı. Buzun çözülmesi için tüplere konulan larvaların üzerine melaninleşmeyi önlemek için birkaç fenilthioure kristali eklendi. Sonra bu tüplere 2 ml sodyum sülfat konularak 24000 devir/dk da 10 dakika homojenize edildi. Bu işlem sonrasında 1/2 oranında hazırlanan kloroform/metanol çözeltisinden 8 ml eklenerek 10 dakika 9000 devir/dk da santrifüj edildi. Santrifüj sonrası karbohidrat analizi için 0.2 ml lipid analizi için 0.2 ml süpernatant alındı.

3.2.2. Karbohidrat miktarı tayini

Karbohidrat miktarı tayini için Van Handel [63] yöntemi uygulandı.

Çözeltiler;

1. %2’lik Na₂SO₄ çözeltisi: 5 gr sodyum sülfat tartıldı üzerine son hacim 250 ml olacak şekilde saf su konuldu çözünme işlemi gerçekleştikten sonra çözelti hazırlandı.

2. ½ oranında kloroform/metanol karışımı: 250 ml kloroform ve 500 ml metanol alındı, ½ olacak şekilde hazırlandı.

3. Antron çözeltisi: 760 ml konsantre sülfürik asit (H₂SO₄) ve 300 ml bidistile su içinde 1,5 gr antron çözüldü.

Karbohidrat miktarı tayini için 0,1 gram glikoz alınıp balon jojeye konularak son hacim 100 ml olacak şekilde 0,1 gr/ml stok glikoz çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti seyreltme yöntemi ile 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/ml glikoz çözeltileri hazırlandı. Her standart çözelti için; cam tüpe 0.2 ml glikoz çözeltisi + 1 ml antron çözeltisi konuldu. 90°C'de 15 dakika benmaride bekletildikten sonra tüpler soğumaya bırakılıp 625 nm absorbans ile spektrofotometrede okundu ve bu veriler ile standart glikoz eğrisi elde edildi.

Karbohidrat tayini için homojenizasyon işlemi sonrası santrifüj edilen numunelerden 0.2 ml cam tüplere konuldu. Cam tüpler 90°C'deki benmariye konuldu ve kloroform/metanol çözeltisi tamamen buharlaşınca kadar beklendi ve tüpler soğumaya bırakıldı. Soğuma işlemi gerçekleştikten sonra üzerine 1 ml antron çözeltisi eklendi ve tüpler 90°C'de 15 dakika benmaride bekletildi. Bu işlem sonrasında tüpler soğumaya bırakıldı ve numuneler 625 nm absorbansta spektrofotometrede okundu. Elde edilen değerler regresyon denkleminde yerine konularak toplam karbohidrat miktarı belirlendi.



Görsel 3.4. Karbohidrat analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi

3.2.3. Lipid miktarı tayini

Van Handel (1985b)[64] yöntemi kullanılarak lipid miktarı tayini gerçekleştirildi.

Çözeltiler;

1. Vanilin - fosforik asit: Hacim 100 ml olacak şekilde 600 mg vanilin sıcak bidistile su içinde çözüldükten sonra üzerine %85'lik 400 ml fosforik asit eklenerek çözelti hazırlandı ve karanlık ortamda saklandı.

2. %2'lik Sodyum sülfat (NaSO₄) çözeltisi: 5 gr sodyum sülfat tartıldı üzerine 250 ml olacak şekilde saf su konuldu çözünme gerçekleştirildikten sonra çözelti hazırlandı.

3. Kloroform/ metanol karışımı: 250 ml kloroform ve 500 ml metanol alındı, oran 1/2 olacak şekilde hazırlandı.

4. Konsantre sülfürik asit(%95-97)

Lipid miktarı tayini için ilk önce lipid standart eğrisi oluşturuldu, lipid standart eğrisi için standart çözelti hazırlandı. Standart çözelti 0.1 gr mısır yağı alındı balon jojeye konuldu ve toplam hacim 100 mililitre olmak üzere kloroform/metanol çözeltisi konuldu. Hazırlanan bu stok çözeltiden seyreltme yöntemi ile 25, 50, 75, 125, 150, 200, 250, 300, 350 µl olan standartlar hazırlandı. Bu standart çözeltilerin her biri için ayrı ayrı 0.2 ml alınıp cam tüpe konuldu. İçinde çözelti bulunan bu cam tüpler 90°C'lik benmaride bekletildi ve içindeki kloroform/metanol çözeltisinin buharlaşması beklendi. Buharlaşma işlemi tamamlandıca üzerine 0.04 ml sülfürik asit çözeltisi konulduktan sonra iyice karıştırıldı ve 2 dakika 90°C'lik benmaride tekrardan bekletildi. Cam tüpler benmariden çıkarılıp soğutulduktan sonra üzerine vanilin - fosforik asit çözeltisinden 960 ml eklendi ve 30 dakika beklendikten sonra köre karşı spektrofotometrede 525 nanometrede okundu. Spektrofotometrede okunan değerler kaydedildi ve lipid standart eğrisi belirlendi

Kör: 0.2 ml bidistile su + 0.04 ml sülfürik asit + 0.96 ml vanilin-fosforik asit

Lipid standart eğrisi için kullanılan Van Handel (1985b)[64] metodu her bir örnek için ayrı ayrı kullanılarak spektrofotometrede 525 nanometrede köre karşı okundu, bu değerler standart eğrisinde yerine konuldu ve lipid miktarı tespit edildi.



Görsel 3.5. Lipid analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi

3.2.4. Böcek homojenizasyonu

Daha önceden yaş ağırlıkları belirlenen *G. mellonella* -80°C'den çıkırılıp buzunun çözülmesi için oda sıcaklığında bekletildi ve melaninleşmeyi önlemek için fenilthioure kristali eklendi. Larvanın buzu çözöldükten sonra üzerine 1/5 oranında pH'ı 7.4 olan fosfat tamponu eklendi ve 24000 devir/dk da homojenize işlemleri gerçekleştirildi. Homojenize işlemleri sonrası tüpler 10000 devir/dk da 30 dakika santrifüj edilip süpernatantları alındı. Bu süpernatantlar toplam protein miktarı, CAT, SOD aktivitesi ve malondialdehit tayini için kullanıldı.

3.2.5. Protein düzeyi tayini

Protein miktarı tayininde Lowry vd.[65] tarafından geliştirilen metot kullanılmıştır.

Çözeltiler;

- 1. Çözelti A: %2'lik Na_2CO_3 (0.1N NaOH içinde):** 2 gr NaOH tartılıp balon jojeye konuldu üzerine bir miktar bidistile su konuldu çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 10 gr sodyum karbonat konulup son hacim 500 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözelti hazırlandı.
- 2. Çözelti B1: %1'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$:** 0.5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ alındı balon jojeye konuldu son hacim 50 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözöldü.
- 3. Çözelti B2: %2'lik Na-K-tartarat:** 1 gr Na-K-tartarat tartılıp balon jojeye konuldu üzerine son hacim 50 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözöldü.
- 4. Çözelti C:** 1 ml çözelti B1, 1 ml çözelti B2 ve 100 ml çözelti A alınıp erlen mayere konulup karıştırılıp çözelti hazırlandı.

5. Folin-ciocalteu Çözeltisi: 10 ml folin-ciocalteu alındı 15 ml bidistile su ile seyreltip hazırlandı.

Protein düzeyi tayininde kullanılan Lowry vd.[65] metodu, ortamda bulunan protein alkali bakır iyonlarının eklenmesi sonucu folin-ciocalteu reaktifi ile redüklenerek mavi renk oluşturma temeline dayanır.

Protein düzeyi tayini için standart eğrisi oluşturuldu. Standart eğrisi için %1'lik bovine serum albumin çözeltisinden seyreltme yöntemi ile 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µ/ml bovine serum albumin içeren çözeltiler hazırlandı.

Kör: 300 µl bidistile su + 3 ml çözelti C+ 300 µl folin-ciocalteu

Her bir konsantrasyon için 300 µl bovine serum albümin + 3 ml çözelti C + 300 µl folin-ciocalteu kullanıldı.

Lowry vd.[65] metoduna göre 750 nanometrede spektrofotometrede okundu ve protein standart eğrisi elde edildi. Standart eğrisi oluşturulduktan sonra deney tüpüne 300 µl örnek konuldu üzerine 3 ml çözelti c eklenip karıştırıldı, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda folin-ciocalteu çözeltisinden 300 µl eklendi ve spektrofotometrede 750 nanometrede okundu. Elde edilen veriler standart eğrisinde yerine konularak protein miktarı belirlendi.

3.2.6. Malondialdehit düzeyinin belirlenmesi

Malondialdehit tayini Barr-Or vd.[66] de geliştirdikleri TBA (tiyobarbitürik asit) metodu kullanılmıştır.

Çözeltiler;

1. %20' lik trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi: Balon jojeye 20 gr TCA tartılıp konuldu üzerine 100 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı.

2. %0.8' lik tiyobarbitürik asit çözeltisi: 0.4 gr TBA tartılıp balon jojeye konuldu ve üzerine son hacim 50 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözünmesi sağlandı.

Malondialdehit tayini için 0.25 ml örnek alındı üzerine 0.125 ml TCA eklendi vortex ile karıştırıldı. Bu örnek 15000 devir/dk da 10 dakika +4°C de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar alınıp cam tüpe konuldu ve üzerine 0.2 ml tiyobarbitürik asit eklendi, ağızları tıpa ile kapatıldı, iyice karıştırıldı. 90°C de bir saat benmaride bekletildi sonra çıkartılıp 535 nanometre de köre karşı okundu.

3.2.7. Süperoksit dismutaz aktive tayini

Çözeltiler;

1. **1g/l bovine serum albumin:** 10 ml albümün alındı son hacim 10 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözüldü
2. **150 ug/l NBT(nitroblue tetrazolium):** 6.15 ml nitroblue tetrazolium tartılıp son hacim 50 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözüldü
3. **0.6mM Etilendiamin tetra asetik asit(EDTA):** 11.15 ml EDTA tartılıp son hacim 50 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözüldü.
4. **400mM Na₂CO₃ (Sodyum karbonat) çözeltisi:** 2.12 gr sodyum karbonat tartılıp son hacim 50 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözüldü.
5. **1N Sodyum hidroksit(NaOH):** 0.4 gr sodyum hidroksit tartılıp son hacim 10 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözüldü.
6. **0.3 mM Ksantin:** 11.41 mg ksantin tartılıp bir kaç damla 1N sodyum hidroksit içinde çözüldükten sonra son hacim 250 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözelti oluşturuldu.

7. Reaktif çözelti: 9 ml albumin çözeltisi, 30 ml NBT çözeltisi, 30 ml etilen diamin tetra asetik asit, 18 ml sodyum karbonat çözeltisi, 60 ml ksantin çözeltisi karıştırılarak çözelti oluşturuldu.

8. 2M (NH₄)₂SO₄ çözeltisi: 13.215 gr amonyum sülfat tartılıp son hacim 50 ml olacak şekilde bidistile su içinde çözöldü.

9. Ksantin oksidaz (5U/l): Ksantin oksidazdan 50 µg alındı 3ml 2M Amonyum sülfat içinde buz soğukluğunda çözöldü

10. 0,8 mM CuCl₂.2H₂O çözeltisi: 34 mg CuCl₂.2H₂O tartılıp son hacim 250 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlanıp çözöldü

SOD aktivite tayininde Sun vd. [67]'nin geliştirdikleri metod kullanılmıştır. Süperoksit dismutaz enzim oluşumu için 2 tüp alındı. Biri kör diğeri örnek için kullanmak üzere belirlendi. Tüplere ayrı ayrı 1.425 ml reaktif çözeltisi konuldu sonrasında bu tüplerden sadece örnek tüpüne 50 µl örnek konuldu. Her iki tüpe 25 µl ksantin oksidaz çözeltisi eklendikten sonra karıştırılıp 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için her iki tüpe 50 µl CuCl₂.2H₂O konuldu ve son olarak kör tüpüne 50 µl örnek konulup spektrofotometrede 560 nanometrede okundu.

3.2.8. Katalaz (CAT) aktivite tayini

Metabolizma sonucu oluşan hidrojen peroksitin katalaz enzimi yardımı ile zamana bağılı ortadan kaldırılması prensibine dayanan Aebi [68]'nin metodu kullanılmıştır.

Çözeltiler;

1. 50mM fosfat tamponu: 7.100 gr Na₂HPO₄ ve 6.810 gr KH₂PO₄ tartıldı bidistile suda çözöldü pH:7.4' e ayarlanıp son hacim 1 litre olacak şekilde hazırlandı.

2. 30mM H₂O₂ (hidrojen peroksit): %30' luk hidrojen peroksitten 850 µl alındı son hacim 250 ml olacak şekilde 50mM fosfat tamponu ile tamamlandı.

CAT aktivitesini belirlemek için iki kuvars küvet alındı, biri kör için diğeri örnek için kullanıldı

Kör : 2.8 ml H₂O₂ + 200 µl fosfat tamponu

Örnek: 2.8 ml H₂O₂ + 200 µl örnek konulup hızlı bir şekilde karıştırılıp 240 nanometrede spektrofotometrede okundu. Başlangıç değeri, 30. saniyedeki değeri ve 60. saniyedeki değeri olmak üzere 3 absorbans not edildi.

3.3. Verilerin istatistiksel analizi

Yapılan çalışmada çıkan sonuçların kendi aralarında karşılaştırılmasında varyans analiz yöntemi, Student Newman Keul's (SNK) testi ile ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, çıkan sonuçlar arasındaki bağın önem düzeyinin belirlenmesinde ise SPSS 20.00 istatistik paket programı kullanıldı. Harfler arasındaki farklar $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel farkın gösterilmesinde kullanıldı. Veriler beş tekrarın ortalaması olarak ifade edildi.

4.BULGULAR

Force-feeding yöntemiyle verilen farklı demir oksit nanopartikül (Fe_2O_3 NP) konsantrasyonlarının (1.00, 2.00, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00 $\mu\text{g/larva}$) *G. mellonella* larvalarının SOD, CAT aktivitesi ve MDA miktarı üzerine etkisi Tablo 4.1 ve 4.2 de gösterilmiştir. Protein, karbohidrat ve lipid miktarı üzerine etkisi ise Tablo 4.3 ve 4.4 de gösterilmiştir.

Farklı oranlarda force-feeding yöntemiyle verilen Fe_2O_3 NP'lerinin 4 saat sonundaki larvaların SOD ve CAT enzimleri ile MDA miktarı üzerine olan etkileri Tablo 4.1 ve Şekil.4.1, Şekil.4.2, Şekil.4.3 de verilmiştir.

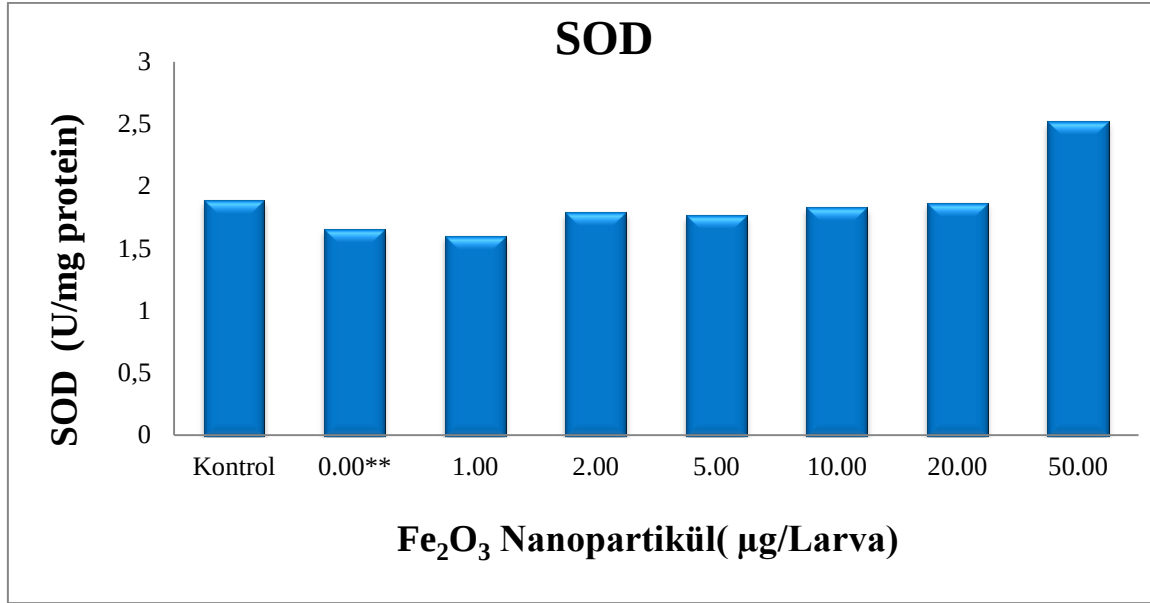
Tablo 4.1. Demir oksit Nanopartiküllerinin *G. mellonella* larvalarının SOD, CAT aktivitelerine ve MDA miktarlarına 4 sonundaki etkileri

Demir Oksit NP ($\mu\text{g/Larva}$)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
0.00*	1.89 $\pm$ 0.04b	6.06 $\pm$ 0.21ab	15.76 $\pm$ 0.70d
0.00**	1.65 $\pm$ 0.02cd	5.87 $\pm$ 0.09ab	17.74 $\pm$ 0.69cd
1.00	1.60 $\pm$ 0.04d	6.17 $\pm$ 0.14ab	20.88 $\pm$ 0.63bc
2.00	1.79 $\pm$ 0.05bc	6.19 $\pm$ 0.04ab	22.81 $\pm$ 0.14b
5.00	1.76 $\pm$ 0.06bc	5.92 $\pm$ 0.25ab	32.21 $\pm$ 2.33a
10.00	1.83 $\pm$ 0.03b	6.49 $\pm$ 0.17a	33.11 $\pm$ 0.73a
20.00	1.86 $\pm$ 0.03b	5.52 $\pm$ 0.05b	23.74 $\pm$ 1.35b
50.00	2.51 $\pm$ 0.04a	6.00 $\pm$ 0.12ab	23.27 $\pm$ 1.54b

* : Kontrol

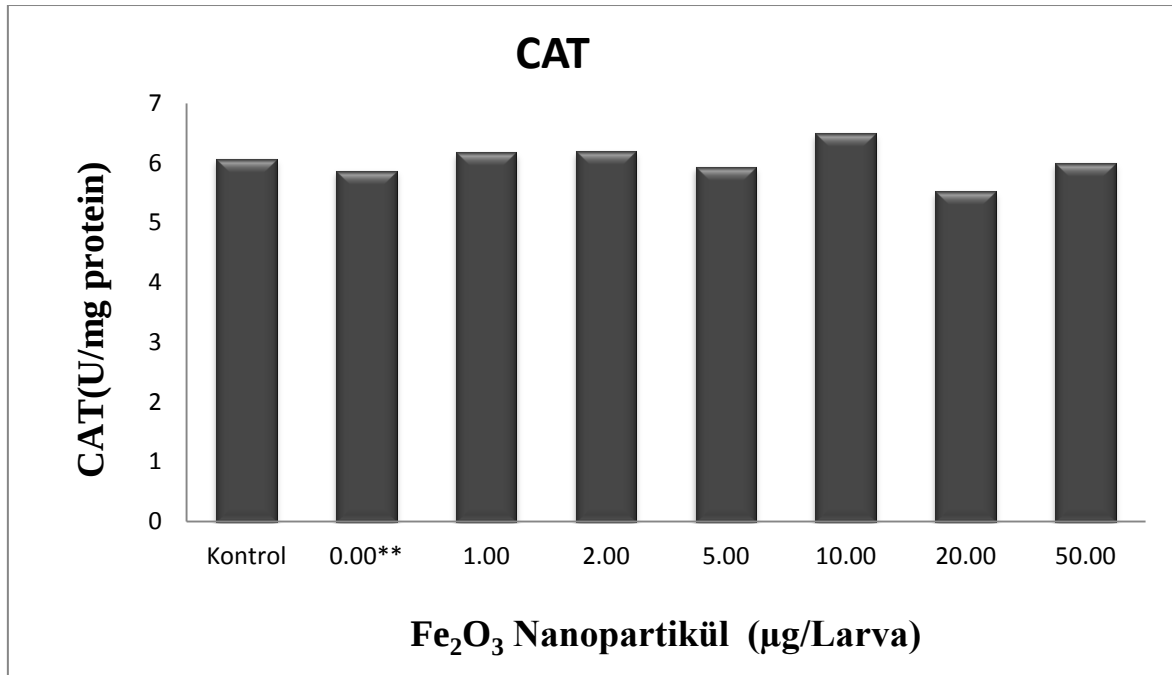
** : Negatif Kontrol

SNK: a, b, c, d, e harfleri konsantrasyonlar arasındaki farkı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Aynı harfi içeren veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayrım vardır.



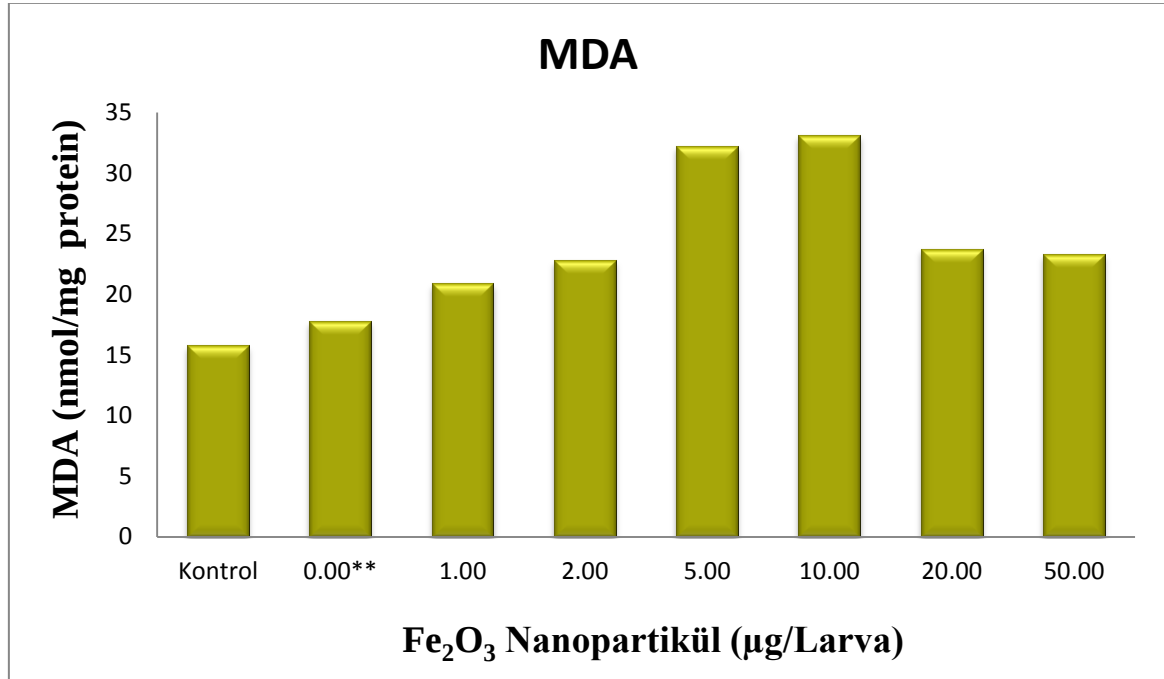
Şekil 4.1. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında SOD aktivitesi üzerine 4 saat sonunda etkisi

Fe₂O₃ nanopartikül uygulamaları sonucu SOD enzim aktivitesi kontrole göre sadece en yüksek doz uygulamasında artmıştır. Denenen oranlardan sadece 1.00 µg SOD aktivitesini düşürürken diğer uygulama oranları herhangi bir etkide bulunmamıştır.



Şekil 4.2. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında CAT aktivitesi üzerine 4 saat sonunda etkisi

Katalaz aktivitesi üzerine force-feeding yöntemiyle Fe_2O_3 NP' leri 4 saat sonunda kontrol grubu üzerine herhangi bir etkide bulunmamıştır. Deney dozları arasında sadece 10.00 ve 20.00 $\mu\text{g/larva}$ arasında fark istatistiki açıdan önemli çıkmıştır. Söz konusu katalaz aktiviteleri sırasıyla 6.49 ve 5.52 U/mg protein olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3. Fe_2O_3 nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında MDA miktarı üzerine 4 saat sonunda etkisi

MDA miktarı 4 saat sonunda kontrol besine göre denenen oranlarda yüksek çıkmıştır. En yüksek MDA miktarı larva başına 5.00 ve 10.00 μg nanopartikül verilen grupta ortaya çıkmıştır. En yüksek iki dozda MDA miktarı ise bu oranlara göre düşüş göstermiştir. 20.00 ve 50.00 $\mu\text{g/larva}$ uygulamaları arasında herhangi bir fark görülmemiştir.

Farklı oranlarda force-feeding yöntemiyle verilen Fe_2O_3 NP' lerinin 24 saat sonundaki larvaların SOD ve CAT enzimleri ile MDA miktarı üzerine olan etkileri Tablo 4.2 ve Şekil.4.4, Şekil.4.5, Şekil.4.6 da verilmiştir.

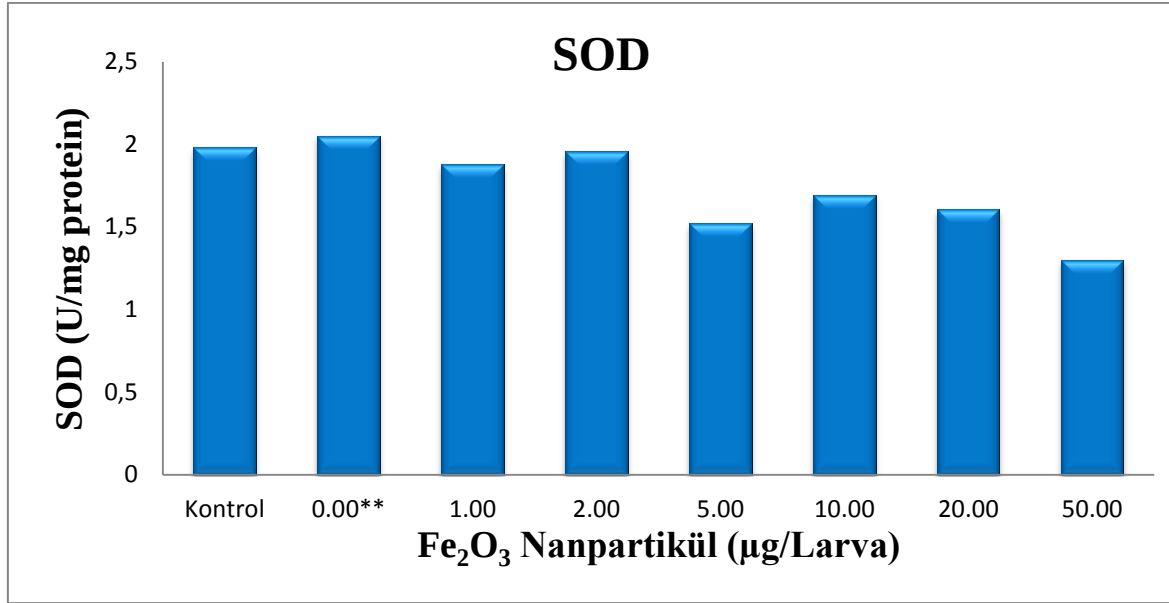
Tablo 4.2. Demir oksit Nanopartiküllerinin *G. mellonella* larvalarının SOD, CAT aktivitelerine ve MDA miktarlarına 24 saat sonundaki etkileri

Demir Oksit NP ($\mu\text{g/Larva}$)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
0.00*	1.98 $\pm$ 0.03a	6.17 $\pm$ 0.13a	18.23 $\pm$ 0.39bc
0.00**	2.05 $\pm$ 0.10a	5.27 $\pm$ 0.22b	18.00 $\pm$ 0.34bc
1.00	1.87 $\pm$ 0.04a	6.17 $\pm$ 0.23a	17.11 $\pm$ 0.76c
2.00	1.95 $\pm$ 0.06a	5.27 $\pm$ 0.30b	17.34 $\pm$ 1.25c
5.00	1.52 $\pm$ 0.03b	4.72 $\pm$ 0.08b	16.33 $\pm$ 0.22c
10.00	1.69 $\pm$ 0.02b	5.99 $\pm$ 0.21a	18.75 $\pm$ 0.21bc
20.00	1.60 $\pm$ 0.04b	4.99 $\pm$ 0.12b	20.23 $\pm$ 0.32ab
50.00	1.29 $\pm$ 0.01c	5.04 $\pm$ 0.09b	21.72 $\pm$ 0.46a

* : Kontrol

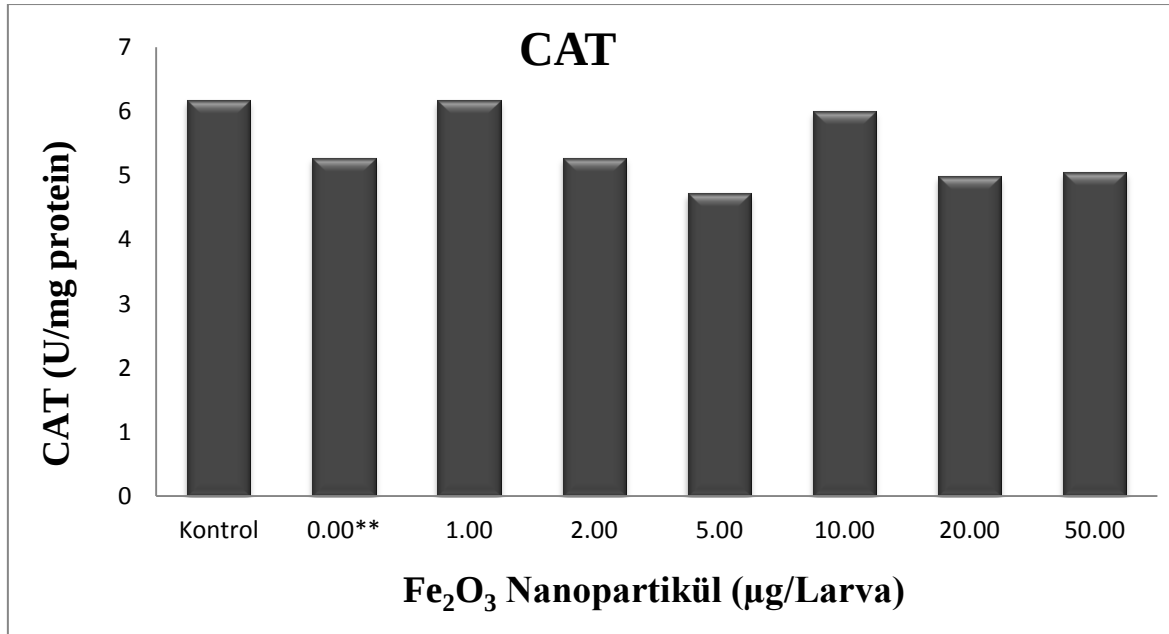
** : Negatif Kontrol

SNK: a, b, c, d, e harfleri konsantrasyonlar arasındaki farkı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Aynı harfi içeren veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayrım vardır.



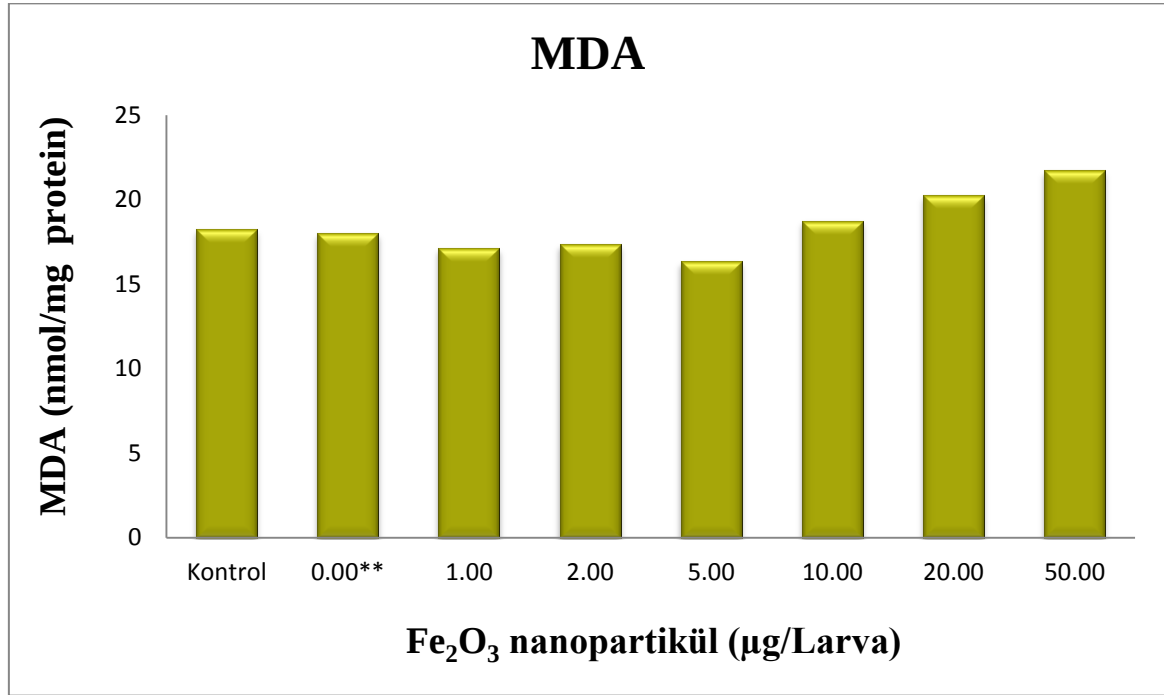
Şekil 4.4. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında SOD aktivitesi üzerine 24 saat sonunda etkisi

Farklı konsantrasyonlara sahip Fe₂O₃ nanopartikülün besin olarak verilen *G. mellonella* larvalarında SOD aktivitesi 5.00 µg ve sonraki Fe₂O₃ NP doz artışına bağlı olarak kontrole göre düşmüştür. 1.00 ve 2.00 µg/Larva uygulamaları ise SOD enzimi üzerine herhangi bir etkiye bulunmamıştır.



Şekil 4.5. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında CAT aktivitesi üzerine 24 saat sonunda etkisi

G. mellonella'ya uygulanan farklı konsantrasyonlardaki Fe₂O₃ nanopartikülünün kontrol grubuna göre düşüşü görülmüştür. En yüksek 2 doz CAT aktivitesini kontrol grubuna göre önemli derecede düşürmüştür. Bununla birlikte denenen hiçbir doz CAT aktivitesini kontrole göre arttırmamıştır.



Şekil.4.6. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında MDA miktarı üzerine 24 saat sonunda etkisi

Farklı oranlarda besin olarak verilen Fe₂O₃ nanopartikülünün kontrol grubuna göre en yüksek dozda yükseliş görülmüştür ancak diğer dozlarda istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir.

Farklı konsantrasyonlardaki, force-feeding yöntemiyle, *G.mellonella* larvalarına verilen Fe_2O_3 NP molekülünün protein, karbohidrat ve lipid miktarına 4 saat sonundaki etkileri Tablo 4.3 ve Şekil 4.7, Şekil.4.8, Şekil.4.9’ da gösterilmiştir.

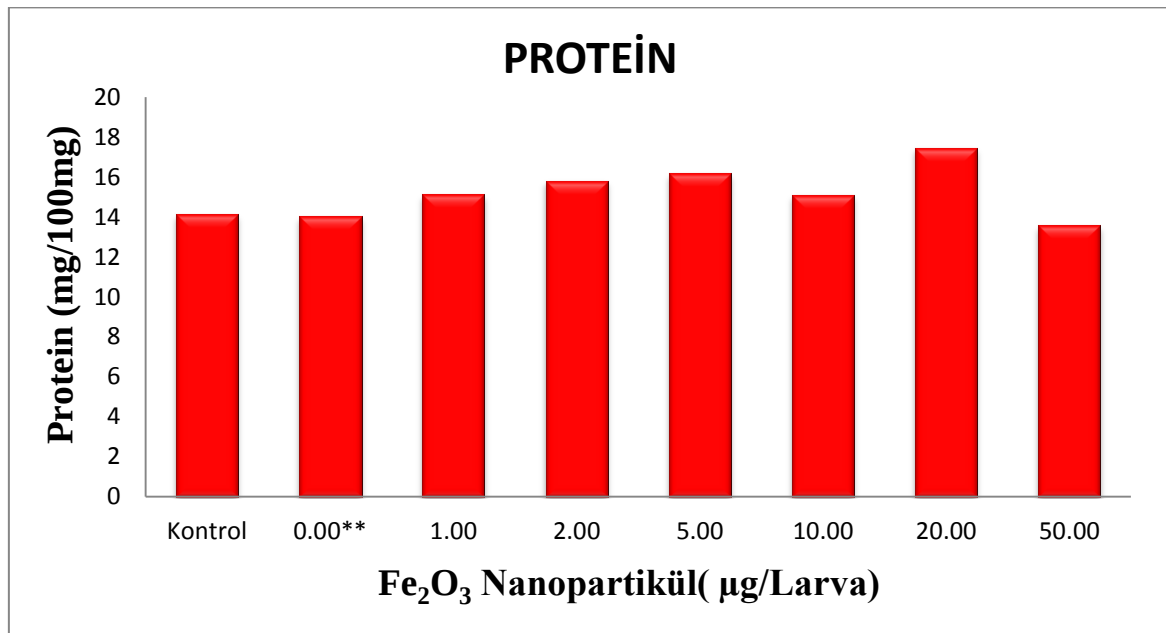
Tablo 4.3. Demir oksit Nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarının protein, karbohidrat ve lipid miktarlarına 4 saat sonundaki etkileri.

Demir Oksit NP ($\mu\text{g}/\text{Larva}$)	Protein mg	Karbohidrat mg	Lipid mg
0.00*	14.14 $\pm$ 0.59cd	11.80 $\pm$ 0.19a	1.28 $\pm$ 0.05ab
0.00**	14.03 $\pm$ 0.39cd	9.20 $\pm$ 0.04b	1.11 $\pm$ 0.06bc
1.00	15.12 $\pm$ 0.35bcd	7.91 $\pm$ 0.32cd	1.42 $\pm$ 0.10a
2.00	15.80 $\pm$ 0.39bc	8.57 $\pm$ 0.41bc	0.95 $\pm$ 0.04c
5.00	16.17 $\pm$ 0.57ab	8.92 $\pm$ 0.29bc	0.95 $\pm$ 0.04c
10.00	15.09 $\pm$ 0.54bcd	7.78 $\pm$ 0.25cd	1.15 $\pm$ 0.11bc
20.00	17.45 $\pm$ 0.31a	7.30 $\pm$ 0.78d	0.99 $\pm$ 0.03c
50.00	13.58 $\pm$ 0.32d	7.16 $\pm$ 0.26d	0.98 $\pm$ 0.39c

* : Kontrol

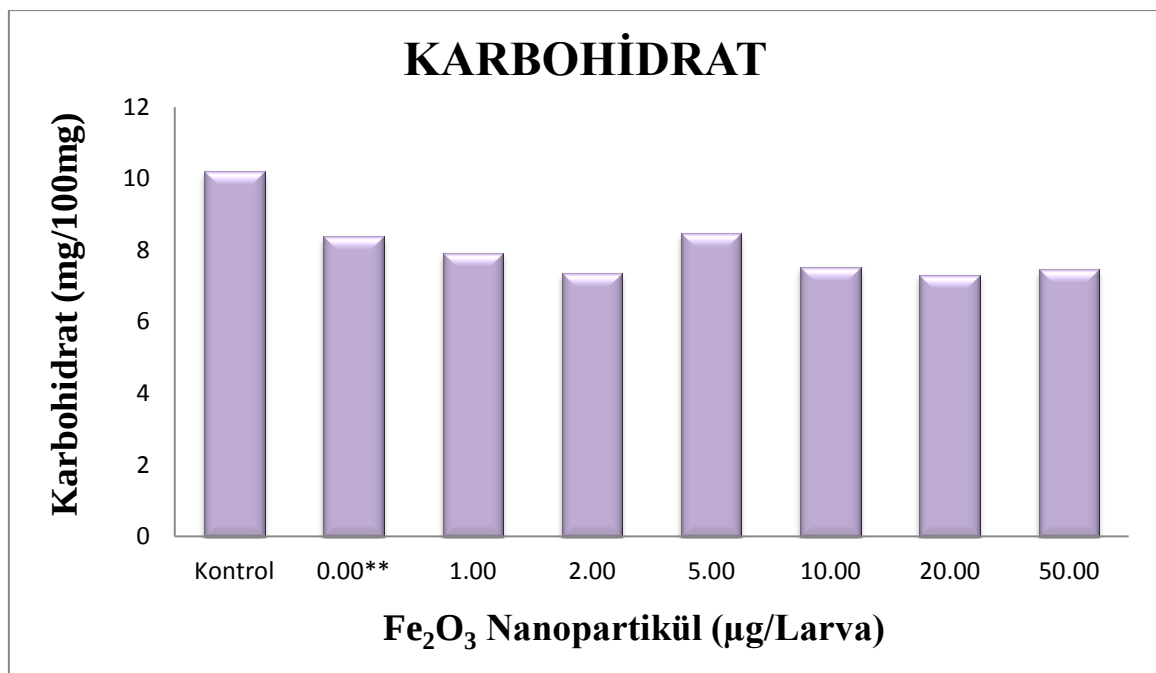
** : Negatif Kontrol

SNK: a, b, c, d, e harfleri konsantrasyonlar arasındaki farkı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Aynı harfi içeren veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım vardır.



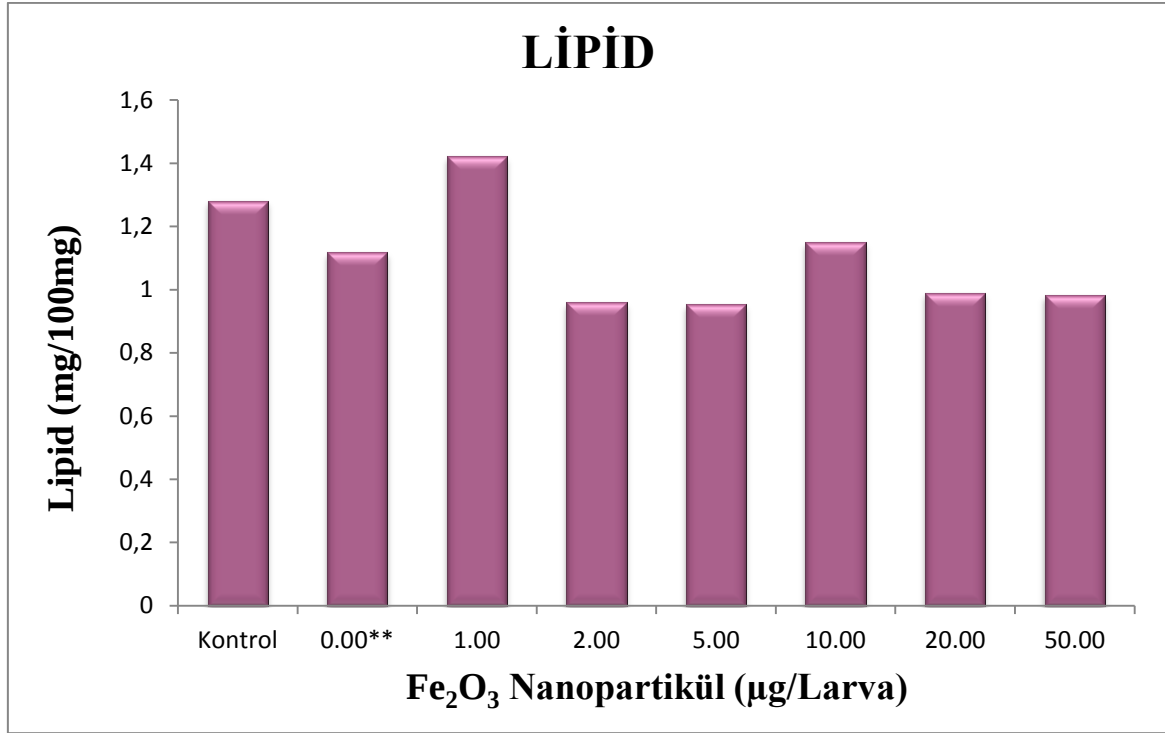
Şekil.4.7. Fe_2O_3 nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında protein miktarı üzerine 4 saat sonunda etkisi

Protein miktarına etkilerinin incelendiği deney serisinde; yüksek konsantrasyondaki Fe₂O₃ NP konsantrasyonlarının besin yoluyla verilmesi sonucu kontrole göre protein miktarında değişimler göze çarpmaktadır. En düşük protein miktarı 50.00 µg/larva olan konsantrasyonda 13.58 mg olarak gerçekleşmiştir. Larvalara verilen 1.00 ve 2.00 Fe₂O₃ NP protein miktarına kontrole göre herhangi bir etkide bulunmamıştır. Konsantrasyonun 20.00 µg/larva olduğu durumda ise protein miktarı kontrole göre önemli bir şekilde artış göstermiştir.



Şekil.4.8. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında karbohidrat miktarı üzerine 4 saat sonunda etkisi

Karbohidrat miktarı 4 saat sonunda uygulanan tüm konsantrasyonlarda kontrole göre önemli bir şekilde düşmüştür. Bazı konsantrasyonlarda istatistiki bir ayrım görülmemesine rağmen, konsantrasyon artışına bağlı olarak lineer bir düşüş göze çarpmaktadır. En düşük karbohidrat miktarı en yüksek konsantrasyon olan 50.00 µg/larva olması durumunda 7.16 mg olarak gözlenmiştir. En yüksek karbohidrat miktarı kontrol grubunda 11.80 mg olarak gerçekleşmiştir.



Şekil.4.9. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında lipid miktarı üzerine 4 saat sonunda etkisi

Force-feeding yöntemiyle verilen farklı demir oksit nanopartikül (Fe₂O₃ NP) konsantrasyonlarının *G.mellonella* lipid miktarına 4 saat sonundaki etkileri Tablo 4.3 ve Şekil 4.9’ de gösterilmiştir. Lipid miktarı 1.00 ve 10.00 µg/larva uygulama dozu dışındaki oranlarda kontrole göre düşmüştür. Söz konusu Fe₂O₃ NP dozları lipid miktarına olumlu veya olumsuz yönde bir etkiye bulunmamıştır. Kontrol ve negatif kontrol verileri arasında istatistiki bir ayırım söz konusu değildir.

Force-feeding yöntemiyle son evre larvalarına verilen farklı demir oksit nanopartikül (Fe_2O_3 NP) moleküllerinin (1.00, 2.00, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00 $\mu\text{g/larva}$) 24 saat sonraki etkileri Tablo 4.4 ve Şekil 4.10, Şekil.4.11, Şekil.4.12’ de gösterilmiştir.

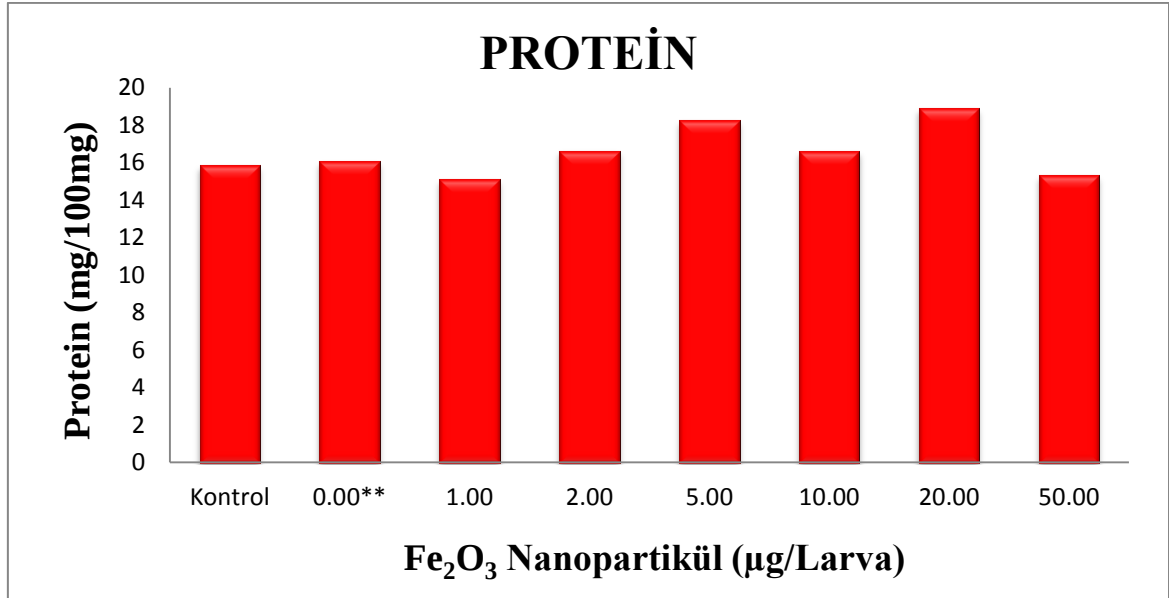
Tablo 4.4. Demir oksit Nanopartiküllerinin *G. mellonella* larvalarının protein, karbohidrat ve lipid miktarlarına 24 saat sonundaki etkileri

Demir Oksit NP ($\mu\text{g/Larva}$)	Protein mg	Karbohidrat mg	Lipid mg
0.00*	15.84 $\pm$ 0.43d	11.28 $\pm$ 0.45a	1.50 $\pm$ 0.07a
0.00**	16.06 $\pm$ 0.54bc	9.09 $\pm$ 0.29b	1.37 $\pm$ 0.05abc
1.00	15.09 $\pm$ 0.73d	7.18 $\pm$ 0.36c	1.45 $\pm$ 0.04ab
2.00	16.63 $\pm$ 0.31bc	6.94 $\pm$ 0.24c	1.20 $\pm$ 0.06bc
5.00	18.25 $\pm$ 0.60ab	7.06 $\pm$ 0.21c	1.07 $\pm$ 0.08c
10.00	16.62 $\pm$ 0.42bc	7.63 $\pm$ 0.18c	1.22 $\pm$ 0.04abc
20.00	18.90 $\pm$ 0.98a	7.10 $\pm$ 0.27c	1.32 $\pm$ 0.08abc
50.00	15.31 $\pm$ 0.39d	6.92 $\pm$ 0.14c	1.24 $\pm$ 0.06abc

* : Kontrol

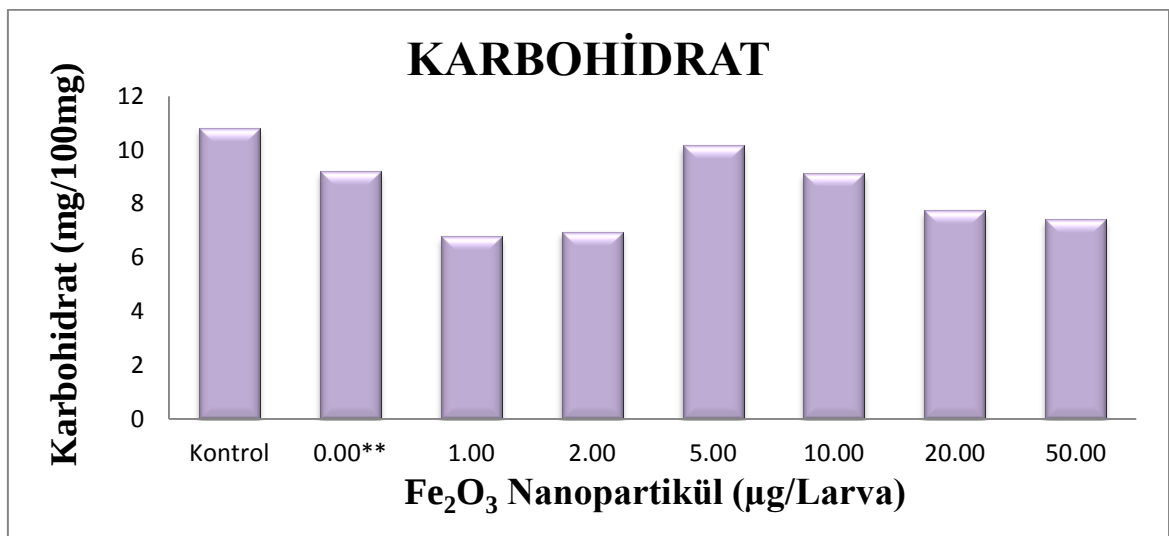
** : Negatif Kontrol

SNK: a, b, c, d, e harfleri konsantrasyonlar arasındaki farkı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Aynı harfi içeren veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım vardır.



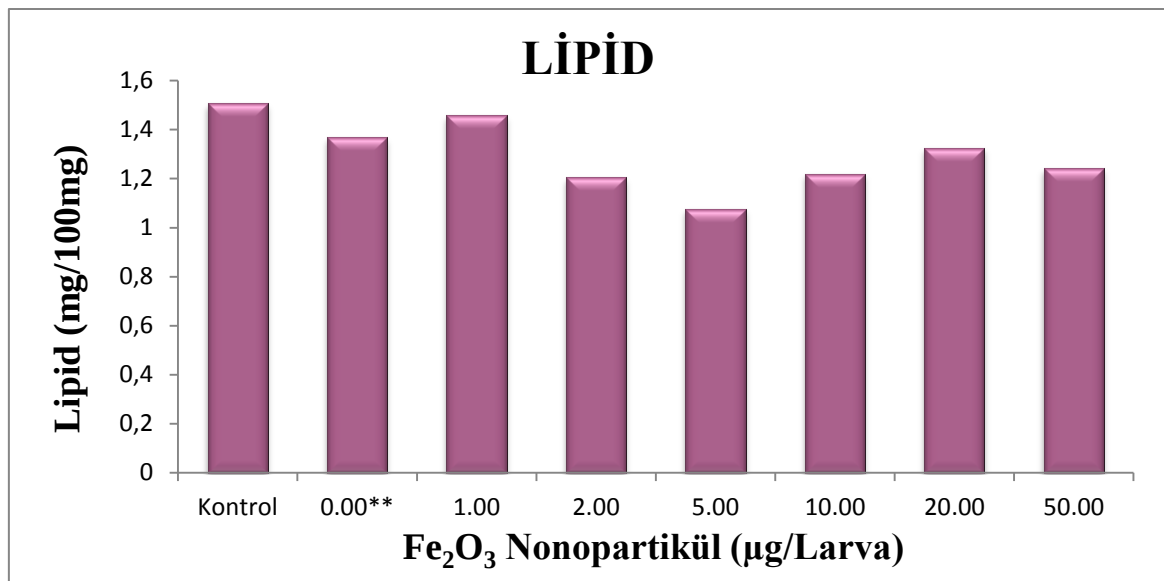
Şekil.4.10. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında protein miktarı üzerine 24 saat sonunda etkisi

Protein miktarı yüksek dozdaki Fe₂O₃ NP uygulamalarında kontrole göre yükselmiştir. En yüksek protein miktarı 18.90 mg olarak 20.00 µg/larva Fe₂O₃ NP verilen böceklerde ölçülmüştür. En düşük protein miktarlarından biri de en yüksek Fe₂O₃ NP konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Benzer bir şekilde Fe₂O₃ NP oranının 1.00 µg/larva olduğu grupta da protein miktarı diğer konsantrasyonlara göre önemli oranda düşmüştür. Denenen Fe₂O₃ NP oranları protein miktarını kontrol grubuna göre etkide bulunmuştur. Söz konusu durum genellikle artış şeklinde kendini göstermiştir.



Şekil.4.11. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında karbohidrat miktarı üzerine 24 saat sonunda etkisi

Karbohidrat miktarı artan Fe₂O₃ NP oranlarına bağlı olarak kontrol grubuna göre önemli derecede düşmüştür. En yüksek karbohidrat miktarı kontrol grubunda ortaya çıkmıştır. Negatif kontrol grubundan elde edilen veriler ile kontrol grubu arasında da farklılıklar göze çarpmaktadır. Kontrol grubunda 11.28 mg ölçülen karbohidrat miktarı negatif kontrol grubunda 9.09 mg bulunmuştur. Denenen Fe₂O₃ NP konsantrasyonları kendi aralarında karbohidrat miktarına artan konsantrasyona bağlı olarak negatif bir etki yapmasına rağmen bu durum istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil.4.12. Fe₂O₃ nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarında lipid miktarı üzerine 24 saat sonunda etkisi

Lipid miktarı Fe₂O₃ NP etkisi altında 24 saat sonunda uygulanan tüm konsantrasyonlarda kontrole göre düşüş göstermiştir. Force-feeding yöntemiyle verilen Fe₂O₃ NP'leri her larva için oranın 2.00 ve 5.00 µg olduğu durumda lipid miktarı sırasıyla 1.20 ve 1.07 mg olarak gerçekleşmiştir. Söz konusu durumda lipid miktarı kontrole göre önemli bir şekilde düşmüştür. Bu şekilde elde edilen sonuçlar lipid miktarı için en düşük verilerdir. Diğer konsantrasyonlardaki düşüşler istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalarda model organizma *G. mellonella* üzerine birçok alanda kullanılan çeşitli özellikteki eksojen ve endojen kaynaklı materyallerin etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda da force-feeding yöntemiyle verilen Fe₂O₃ nanopartikülünün SOD, CAT enzimlerine etkileri, MDA miktarı, total karbohidrat, total protein ve total lipid oranı üzerine etkileri araştırıldı. Yapılan çalışmada inceleme yapılan parametreler üzerine Fe₂O₃ nanopartikülünün etkisinin olduğu ortaya konmuştur.

Geçiş metalleri, birçok önemli biyolojik süreçte yer almasından dolayı canlı organizmaların hayati fonksiyonları için çok önemlidir. Bu metaller genellikle metalloproteinler sınıfına dahil edilmekle birlikte metalloenzimler, depo proteinleri ve transkripsiyon faktörleri de bu gruba dahil edilmektedir. Bu metaller içinde demirin solunum ve bazı metabolik süreçlerde önemli görevi vardır. Tüm canlı organizmalar hayatta kalmak için geçiş metallerine ihtiyaç duyar, ancak bu metallerin katalitik aktiviteleri toksisitelerini güçlendirir. Bu nedenle geçiş metallerinin oranı dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir.

Ksenebyotikler, canlı organizma ile metabolik etkileşimi sonucu moleküler düzeyde hücrelerde lipid peroksidasyonuna neden olarak etkilerini toksik düzeyde göstermektedir.[69,70,71] Bu durumda toksikantlar hücre zar yapısının ve homeostazinin bozulmasına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu MDA son ürün olarak bu durumdan sorumlu molekül olarak karşımıza çıkmaktadır. Sonuç olarak hücrede apoptotik süreçlerin başlaması olağan bir durumdur. Yapmış olduğumuz çalışmada en yüksek konsantrasyondaki MDA düzeylerindeki artışın CAT aktivitesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu antioksidan, enzim aktivitelerindeki düşüş hücreleri oksidatif stresin olumsuz etkisine karşı korunaksız hale getirmiş ve artan lipid peroksidasyonu MDA düzeyleri değişmiş olabilir.

Nanopartiküllerin kalp, karaciğer, dalak, böbrek ve beyin gibi hassas organlarda inhalasyon, yutulma ve cilt temasından sonra birikmesi muhtemeldir.[72,73]

In vitro ve in vivo çalışmalar, nanopartiküllere maruz kalmanın, toksisiteye yol açan baskın bir mekanizma olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükleyebileceğini göstermektedir[74,75]. Aşırı ROS üretimi oksidatif strese, inflamasyona ve ardından proteinlere, hücre zarlarına ve DNA'ya zarar verir[76-79]. Nanopartiküller tarafından indüklenen ROS üretimi, boyut, şekil, yüzey, bileşim,

çözünürlük, agregasyon ve parçacık alımı ile kontrol edilir[80-85]. Metalik bir nanomalzemenin toksisitesi, oksidasyon durumuna, ligandlara, çözünürlüğe ve morfolojiye, çevre ve sağlık koşullarına bağlı olarak değişebilir.

Nanopartiküller tarafından indüklenen ROS üretim seviyesi, boyut, şekil, yüzey, bileşim, çözünürlük, agregasyon, parçacık alımı, mutajenlerin varlığı ve parçacıklara bağlı geçiş metalleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır[79,80,82,84,86-89]. Bu durum özellikle çalışmamızdaki SOD ve CAT enzim oranlarında değişim olmamasını açıklamaktadır. Belki de kullanılan nanopartikül boyutu veya süreye bağlı olarak SOD ve CAT enzim değişikliği görülmemiştir.

Yapılan başka bir çalışma karaciğer fonksiyon enzimlerinin, oksidatif stres belirteçlerinin ve karaciğer histolojik kesitlerinin titanyum oksit nanopartiküllerinin dozu ve zamanı ile büyük ölçüde etkilendiğini göstermiştir[90]. Özellikle böceklerde orta bağırsak besinlerin sindirimi ve emilimi, bağırsak mikrobiyotası ile besin sentezi ve yağ dokuda humoral ve hücreler bağışıklık tepkisinin düzenlenmesi ve morfolojik değişimlerin de dahil olmak üzere anabolik ve katabolik metabolizmanın gerçekleştirilmesinde ve düzenlenmesinde etkilidir. Yapılan çalışmada Cu veya Zn'nin bağırsakta, yağ dokuda ve ipek bezlerinde biyobirikimi, bu organlarda olduğu için çoklu homeostatik fonksiyonlara müdahale etmesi muhtemeldir[91-93]. Benzer durum yapmış olduğumuz çalışmada da görülmüş olabilir. Bununla birlikte gümüş nanopartikülleri etkisinde *S. litura* bireylerinde SOD aktivitesinin arttığı bildirilmiş olup *E. fetida* ve *G. mellonella* türlerinde çinko ve bakır nanopartikülleri etkisi altında SOD oranının azaldığı bildirilmiştir[94-96].

İnsan ve euroblastoma hücre hattında ve nöral kök hücrelerde demir oksit nanopartiküllerinin akut toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar, ROS kalsiyum homeostazı, mitokondriyal bütünlük ve hücre morfolojisinde hücre tipine ve türe özgü yanıtı ortaya koyarak hücreler homeostazın farklı şekillerde bozulduğunu göstermiştir[97].

SOD enzim aktivitesinin, artan süperoksit radikal üretimine bağlı olarak hücreleri bu radikal etkilerinden korumak için arttığı bilinmektedir. Antioksidan enzim aktivitelerindeki artışların kirleticilere karşı bir adaptasyon yanıtı olarak oluştuğu ve kirleticilerin etkisinde oluşan durumun nötralize edilmesinde önemli olduğu belirtilmektedir.

Besinler organizma sağlığına olumlu katkıda bulunurken, yetersiz ve aşırı beslenme sonucunda oluşan sağlık problemleri taksonlar arasında büyük sorun teşkil etmektedir[98].

Böcekler de diğer canlılar gibi hayatsal faaliyetlerinin devamı için besinlere ihtiyaç duyar. Protein, karbohidrat ve lipid ihtiyaçları türden türe farklılık göstereceği gibi aynı türün bireyleri arasında ve gelişim evrelerinde bile farklılık gösterebilir.

Hemolenf, böceklerde besinsel ve immünolojik homeostazın ana düzenleyicisi olduğundan besin bileşenleri ve alınan besinin kalitesi böceğin yaşamı için en önemli grubu oluşturmaktadır.

Besin depolaması için önemli bir yer hemolenf, trehaloz ve glikoz gibi şekerler ve mannitol ve sorbitol gibi şeker alkolleri, serbest amino asitler ve ayrıca çeşitli peptitler ve proteinler içerir. Bu nedenle bir mikroorganizma için böcek hemolenfi, besin açısından zengin, dengeli iyonik bileşimli ve nötre yakın pH'lı bir ortam olduğu için en iyi yerdir. Buna karşılık, hemolenf immolojik olarak birçok faktörü bileşenlerinde bulundurduğundan organizmanın bağışıklık merkezidir [99-104].

Besinlerin böcek homeostazisinde ve immünolojik fonksiyonların düzenlenmesindeki kanıtlanamaz rolü yapılan çalışmanın önemini bir kez daha ortaya koymuştur.

Çalışmamızda Fe_2O_3 nanopartikül etkisinde görülen total protein miktarları açısından kontrol grupları ve deney grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olmamasının nedeni böcekteki protein seviyelerinin genel olarak korunması olabilir. Önemsiz seviyelerde azalma görülmesinin nedeni ise NP'lerin, böcekte stres koşullarını tetiklemesi ve protein katabolizmasının böcekte rol alması olabilir[105]. Bazı konsantrasyonlardaki protein miktarlarındaki artış ise özellikle nanopartiküllerin juvneil hormon yapısı üzerine olan etkisi ile açıklanabilir. Bu durumda böceklerin metamorfoz geçişleri engellenmiş ve dolayısı ile böceklerde olası kütleli bir artışa[106] gidildiğinden dolayı protein miktarındaki artışların normal olduğu söylenebilir. Özellikle karbohidrat miktarlarındaki azalışın böceklerin stres ile baş edebilmesi için karbohidrat kaynaklarını tüketmesi sonucu olmaktadır. Bu durumun daha iyi açıklanabilmesi için farklı boyut, süre ve uygulama metotlarına ihtiyaç olduğu bir gerçektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Zorla besleme, bir insanı veya diğer hayvanları iradeleri dışında besleme uygulamasıdır. Günümüzde, mikroorganizmaların veya toksik maddelerin toksisitesi, zorla besleme uygulamaları ile böcekler üzerinde gerçekleştirilmektedir. Bu anlamda bu durumun model organizma *G. mellonella* üzerinde gösterilmiş olması çalışmanın önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Yüksek konsantrasyonlari özellikle karbohidrat ve MDA düzeylerindeki lineer artış ve azalışlar biyobelirteç olarak kullanılabilir.

Elde edilen sonuçların özellikle ümmun sistem cevapları açısından insanlar ile ilgili yapılacak çalışmalarda kullanılabilmesi açısından önemlidir. Farklı boyut ve sürelele göre özellikle akut ve kronik olarak verilecek olan farklı nanopartüklere ile yapılacak çalışmalara neden model olması açısından önemlidir.

KAYNAKÇA

- [1] Buzea, C., Blandino, I.I.P., and Robbie, K. (2007). “Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity.” *Biointerphases*, 2(4), 17-71
- [2] Taniguchi, N., (1974). “On the Basic Concept of Nanotechnology.” *Proceedings of the International Conference on Production Engineering*, Tokyo, 18-23.
- [3] Kittelson, D.B., (2001). “Recent Measurements of Nanoparticle Emission from Engines.” *Current Research on Diesel Exhaust Particles*, Tokyo, Japan.
- [4] Feynman, R.P., (1959), “There's Plenty of Room at the Bottom.” *Annual meeting of the American Physical Society*, California Institute of Technology, California, USA.
- [5] <https://ahmetakgonul.weebly.com/kullan305m-alanlar305.html> (21.05.2022)
- [6] Lewinski, N., Colvin, V., and Drezek, R., (2008). “Cytotoxicity of Nanoparticles” No. 1, 26 – 49
- [7] Yaqoob, A. A., Ahmad, H., Parveen, T., Ahmad, A., Oves, M., Iqbal, M. L., Umar, Q. H. A., and Ibrahim M. N. M., (2020). “Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review” *Frontiers in Chemistry*, 3:341
- [8] Gürmen, S. ve Ebin, B., (2008). “Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri-I”, *Metalurji Dergisi*, 150:31-38.
- [9] Ercan, İlkyaz Çetin, (2019), “Demir Oksit Nanoparçacıklarının Ağır Metal Adsorpsiyonunda Kullanımı.” *Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- [10] <http://news.nanoapex.com/modules.2007> (26.05.2022)
- [11] Wong, Colvin and Hughes, (2002). “Nanocatalysts for remediation of environmental pollutants.” *Center for Biological and Environmental Nanotechnology. Annual Report to the National Science Foundation*. 60-62.
- [12] <http://cohesion.rice.edu/centersandinst/cben/research.cfm?doc id=5100>. (07.03.2022).
- [13] Alyüz, B., ve Veli, S., (2005). “Low-cost adsorbents used in heavy metal contaminated waste water treatment.” *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 3, 94-105,
- [14] Güven, G., (2005). “Eş Boyutlu, Katyonik, Fonksiyonel Grup İçeren/İçermeyen, Manyetik Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Nükleik Asit Uygulamaları”, *Doktora Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [15] Can, M., (2005). Manyetik Nanoparçacıkların Fiziksel Özelliklerinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- [16] Liong, S., (2005). A Multifunctional Approach to Development, Fabrication and Characterization of Fe₃O₄ Composites, Doktora Tezi, Georgia Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Georgia.
- [17] Oskay, E., (2003). Treatment of Wastewater Using Magnetite, Dokuz Eylül Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [18] https://animaldiversity.org/accounts/Galleria_mellonella/classification/ (11.4.2022)
- [19] Makori, D. M., Fombong, A. T., Abdel-Rahman, E. M., Nkoba, K., Ongus, J., Irungu, J., Mosomtai, G., Makau, S., Mutanga, O., Odindi, J., Raina, S., and Landmann, T., (2017). "Predicting spatial distribution of key honeybee pests in Kenya using remotely sensed and bioclimatic variables: Key honeybee pests distribution models." ISPRS International Journal of GeoInformation, 6(3), 1–20.
- [20] Sefer, N. E., ve Büyükgüzel, K., (2018). "Piperazinin *Galleria mellonella*'nın Yaşama ve Gelişimi Üzerine Etkisi." Karaelmas Fen ve Müh. Derg., 8(1), 365–372.
- [21] Özer, M. (1961). "Arı Kovanlarında Önemli Zarar Yapan Bal Mumu Güvesinin (*Galleria mellonella*) Morfoloji, Biyoloji ve Yayılışı Üzerinde Araştırmalar." Tarım Bakanlığı, Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü, Bitki Koruma Bölümü, 2(12), 26-35.
- [22] Ellis, J. D., Graham, J. R., and Mortensen, A., (2013). "Standard Methods for Wax Moth Research." Journal of Apicultural Research, 52 (1): 1-17.
- [23] Hosamani, V., Hanumantha, S. B. C., Kattimani, K. N., and Kalibavi, C. M., (2017). "Studies on Biology of Greater Wax Moth (*Galleria mellonella* L.)." International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(11), 3811–3815.
- [24] Ali, A.D., Bakry, N.M., Abdellatif, M.A., and El-Sawaf, S.K. (1973). "The Control of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L., by Chemicals I. Susceptibility of the Wax Moth Larvae and Honey-Bee Workers to Certain Chemicals Z. Ang. Entomology, 74, 170-177.
- [25] Sen, S., and Chakraborty, R., (2011). "The role of antioxidants in human health." American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy, 1: 1-37.
- [26] Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huy, C., (2008). "Free radicals, antioxidants in disease and health." International journal of biomedical science: IJBS, 4(2), 89.

- [27] Shinde. A., Ganu, J., and Naik, P., (2012). "Effect of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress: A Review." *Journal of Dental and Allied Sciences*, 1(2), 63.
- [28] Karabulut, H., ve Gülay, M.Ş., "Antioksidanlar", *Mehmet Akif Ersoy Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1, 1, 1,
- [29] Devasagayam, T. P. A., Boloor, K. K., and Ramasarma, T., (2003). "Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits." *Indian Journal Biochemistry & Biophysics* 40, 300-308
- [30] Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N.,(2010). "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health." *Pharmacogn Review*, 4(8), 118–126.
- [31] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol. J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser. J., (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- [32] Halliwell, B., and Gutteridge, J. M., (2015). "Free radicals in biology and medicine." Oxford University Press, USA.
- [33] Poljsak. B., Jamnik, P., Raspor, P., and Pesti, M.,(2011). "Oxidation-antioxidation-reduction processes in the cell: impacts of environmental pollution." N. Jerome (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health*, Elsevier, 300-306.
- [34] Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., and De, B.,(2010). "Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect." *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3(1), 91-100.
- [35] Fang, Y.Z., Yang, S., and Wu, G., (2002). "Free radicals, antioxidants and nutrition." *Nutrition*, 18, 872-9.
- [36] Hermes-Lima, M., and Zenteno-Savin, T., (1998). "Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress." *Comparative Biochemistry Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4), 537–556.
- [37] Serafini, M., and Del Rio, D., (2004). "Understanding the Association Between Dietray Antioxidants, Redox Status and Disease: Is the Total Antioxidant Capacity the Right Tool" *Redox Report*, 9 (3), 145-152.
- [38] Berlett, B.S.,and Stadtman, E.R. (1997). "Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress." *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313-20316.
- [39] Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., and Vasseur, P., (1997). "Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid Peroxidation in Freshwater Bivalves, *Unio Tumidus*, As Biomarkers of

Aquatic Contamination in Field Studies.” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38, 122-131.

[40] Walker, C.H., (1995). “Biochemical Biomarkers in Ecotoxicology-Some Recent Developments.” *The Science of The Total Environment*, 171, 189-195.

[41] Wydert, J.C., and Cullen, J.J. (2010). “Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione peroxidase in Cultured Cells and Tissue.” *Nat Protoc*, 5(1), 51–66.

[42] Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., ve Yönden, Z (2015). “Oksidatif Stres ve Hücre içi Lipid, Protein ve DNA Yapıları Üzerine Etkileri.” *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.

[43] Young I S and Woodside J V (2001). “Antioxidants in health and disease.” *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186

[44] Burtis, C.A., and Ashwood, E.R., (1999). “Tietz Textbook of Clinical Chemistry.” 3rd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1838.

[45] Sun, Y., Oberley, L.W., and Li, Y., (1988). “A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase.” *Clinical Chemistry*, 34(3), 497–500.

[46] Ayala, A., Munoz, MF., and Argüelles, S.,(2014). “Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*

[47] Ighodaro OM, and Akinloye OA.(2018). “First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid.” *Alexandria Journal of Medicine* 54, 287–293

[48] Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC, and Rao VR.(2009). “Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson’s disease.” *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*; 13(2), 129– 132

[49] Young IS and Woodside J V. (2001). “Antioxidants in health and disease.” *J Clin Pathol.*; 54: 176-186.

[50] Frankel, E.N., and Neff W.E.,(1983). “Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim Biophys Acta* 754(3): 264- 270.

[51] Remya, A. S., Ramesh,M., Saravanan, M., Poopal, R. K., Bharathi, S., and Nataraj,D, (2015). “Iron oxide nanoparticles to an Indian major carp, *Labeo rohita*: Impacts on hematology, iono regulation and gill Na⁺/K⁺ ATPase activity.” *Journal of King Saud University – Science* 27(2), 151-160

- [52] Zhang, Y., Zhu, L., Zhou, Y., and Chen, J., (2015). "Accumulation and elimination of iron oxide nanomaterials in zebrafish (*Danio rerio*) upon chronic aqueous exposure." The Research Center for Eco-Environmental Sciences, 30, 223-230
- [53] Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Kaya, H., Yılmaz, S., ve Camas, M., (2016). "Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses" Aquatic Toxicology. 177, 22-32
- [54] Akbary, P., and Jahanbakhshi, A., (2019). "Nano and macro iron oxide (Fe_2O_3) as feed additives: Effects on growth, biochemical, activity of hepatic enzymes, liver histopathology and appetiterelated gene transcript in goldfish (*Carassius auratus*)" Aquaculture 510, 191–197.
- [55] Ramalingam, V., Harshavardhan, M., Kumar, S. D., and Malathi, S., (2020). "Wet chemical mediated hematite $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles synthesis: Preparation, characterization and anticancer activity against human metastatic ovarian cancer." Journal of Alloys and Compounds 834, 155118
- [56] Thangapandiyan, S., Alisha, A.S.A., and Anidha, K., (2020). "Growth performance, hematological and biochemical effects of iron oxide nanoparticles in *Labeo rohita*" Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 25, 101582
- [57] Tombuloglu, H., Slimani, Y., AlShammari, T. M., Bargouti, M., Ozdemir, M., Tombuloglu, G., Akhtar, S., Sabit, H., Hakeem, K. R., Almessiere, M., Ercan, I., and Baykal, A., (2020). "Uptake, translocation, and physiological effects of hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanoparticles in barley (*Hordeum vulgare* L.)" Environmental Pollution 266, 115391
- [58] Eskin, A. N., Öztürk, Ş., ve Eskin, A., (2021). "The Effects of Magnetic Iron oxide Nanoparticles (Fe_3O_4) on Some Biological Aspects of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)" Celal Bayar University Journal of Science 17, 319-324
- [59] Faria, J. M. L., Guimarães, L. N., Silva, V. C., Lima, E. C. O., and Sabóia-Morais, S. M. T., (2021). "Recovery trend to co-exposure of iron oxide nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) and glyphosate in liver tissue of the fish *Poecilia reticulata*." Chemosphere 282, 130993
- [60] Gonçalves, B. B., Dias, F.C., Trigueiro, N. S. S., Marques, E., Rodrigues, C. C., Madureira, I. B., Qualhato, G., Sabóia-Morais, S. M. T., and Rocha, T. L., (2021). "Chronic exposure to iron oxide nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) induces gonadal histopathology on male guppies (*Poecilia reticulata*)." Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management 16, 100522

- [61] Khoei, A. J., (2021). "Evaluation of potential immunotoxic effects of iron oxide nanoparticles (IONPs) on antioxidant capacity, immune responses and tissue bioaccumulation in common carp (*Cyprinus carpio*)" Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 244, 109005
- [62] Bronskill, J.K. (1961). "A cage to simplify the rearing of greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyrilidae)". Journal of Lepidopterist Society, 15 (2), 102-104.
- [63] Van Handel, E. (1985a). "Rapid determination of glycogen and sugar in mosquitoes". Journal of the American Mosquito Control Association, 1, 299-304.
- [64] Van Handel, E. (1985b). "Rapid determination of total lipids in mosquitoes". Journal of the American Mosquito Control Association, 1, 302- 304.
- [65] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent". Journal of Biological Chemistry, 193 (1), 265–75.
- [66] Barr-Or, D., Rael, L.T., Lau, E.P., Rao, N.K.R., Thomas, G.W., Winkler, J.V., Yukl, R.L., Kingston, R.G., and Curtis, C.G. (2001). "An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala -His- Lys) prevents formation of copper induced reactive oxygen species". Biochemical and Biophysical Research Communications, 284, 856–862.
- [67] Sun, Y., Oberley, L.W. and Li, Y. (1988). "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase." Clinical Chemistry, 34 (3), 497–500.
- [68] Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro". Methods in Enzymology, 121-126.
- [69] Cc, S., Anusri, A., Levna, C., Pm, A., and Lekha, D., (2020). "MoS(2) nanoparticles induce behavioral alteration and oxidative stress mediated cellular toxicity in the social insect *Oecophylla smaragdina* (Asian weaver ant)." Journal Hazardous Materials 385, 121624.
- [70] Mwaanga, P., Carraway, E.R., and van den Hurk, P., (2014). "The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles." Aquatic Toxicology, 150, 201–209.
- [71] Parenti, C.C., Ghilardi, A., Della Torre, C., Magni, S., Del Giacco, L., and Binelli, A., (2019). "Evaluation of the infiltration of polystyrene nanobeads in zebrafish embryo tissues after shortterm exposure and the related biochemical and behavioural effects." Environmental Pollution., 254(A), 112947.
- [72] Hodgson, E.,(2004). "Exposure classes, toxicants in air, water, soil, domestic and occupational settings." A Textbook of Modern Toxicology. 33.

- [73] Desai, N.,(2012). “Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics.” AAPS Journal, 14(2):282-95.
- [74] Castro, B.M.M., Santos-Rasera, J.R., Alves, D.S., Marucci, R.C., Carvalho, G.A., and Carvalho, H.W.P., (2021). “Ingestion and effects of cerium oxide nanoparticles on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).” Environmental Pollution, 279, 116905.
- [75] Cho, W.S., Kang, B.C., Lee, J.K., Jeong, J., Che, J.H., and Seok, S.H., (2013). “Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration.” Particle and Fibre Toxicology 10, 9.
- [76] Ahamed, M., Siddiqui, M.A., Akhtar, M.J., Ahmad, I., Pant, A.B., and Alhadlaq, H.A.,(2010). “Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells.” Biochemical and Biophysical Research Communications, 396 (2), 578–583.
- [77] Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz,K., and Abdollahi, M., (2016). “Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models.” Iranian Biomedical Journal, 20 (1), 1–11.
- [78] Shin, S.W., Song, I.H., and Um, S.H., (2015). “Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity.” Nanomaterials, 5 (3), 1351-1365.
- [79] Tan, K.X., Barhoum, A., Pan, S., and Danquah, M.K.,(2018). “Risks and toxicity of nanoparticles and nanostructured materials.” Emerging Applications of Nanoparticles and Architectural Nanostructures, 121-139.
- [80] Fu, P., Xia, Q., Hwang, H., Ray, P., and Yu, H., (2014). “Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species.” Journal of Food Drug Analysis, 22(1), 64–75.
- [81] Gatoo, M.A., Naseem, S., Arfat, M.Y., Mahmood, D.A., Qasim, K., and Zubair, S., (2014). “Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations.” Biomed Research International, 1-8.
- [82] He, X., Aker, W.G., Fu, P.P., and Hwang, H.M., (2015). “Toxicity of engineered metal oxide nanomaterials mediated by Nano–Bio–Eco–interactions: a review and perspective.” Environmental Science: Nano, 2(6), 564–582.
- [83] Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y., Dufresne, A., and Danquah, M., (2018). “Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations.” Beilstein Journal Nanotechnology, 9, 1050–1074.
- [84] Manke, A., Wang, L., and Rojanasakul, Y., (2013). “Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity.” Biomed Research International, 1-15.

- [85] Shvedova, A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., and Kagan, V., (2012). "Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(2), 121–133.
- [86] Asmatulu, R., Nguyen, P., and Asmatulu, E., (2013). "Nanotechnology safety in the automotive industry." *Nanotechnology safety*, 57–72.
- [87] Asmatulu, R.E., (2013) *Nanotechnology safety*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam
- [88] Fard, J., Jafari, S., and Eghbal, M., (2015). "A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles." *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), 447–454.
- [89] Liu, G., Gao, J., Ai, H., and Chen, X., (2013). "Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles." *Nano-Mikro Small: Nanotoxicology*, 9(9–10):1533–1545.
- [90] Rizk, M.Z., Ali, S.A., Hamed, M.A., El-Rigal, N.S., Aly, H.F., and Salah, H.H., (2017). "Toxicity of titanium dioxide nanoparticles: effect of dose and time on biochemical disturbance, oxidative stress and genotoxicity in mice." *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 90, 466–472.
- [91] Chen, Z., Han, S., Zhou, D., Zhou, S., and Jia, G., (2019). "Effects of oral exposure to titaniumdioxide nanoparticles on gut microbiota and gut-associated metabolism in vivo." *Nanoscale*, 11, 22398–22412.
- [92] Li, G., Xia, X., Zhao, S., Shi, M., Liu, F., and Zhu, Y., (2020a). "The physiological and toxicological effects of antibiotics on an interspecies insect model." *Chemosphere*, 248
- [93] Xu, Y., Wang, W., Ma, L., Cui, X., Lynch, I., and Wu, G., (2020). "Acute toxicity of zinc oxide nanoparticles to silkworm (*Bombyx mori* L.)." *Chemosphere*, 259.
- [94] Yasur, J., and Rani, P.U., (2015). "Lepidopteran insect susceptibility to silver nanoparticles and measurement of changes in their growth, development and physiology." *Chemosphere*, 124, 92–102.
- [95] Li, L.Z., Zhou, D.M., Peijnenburg, W.J., van Gestel, C.A., Jin, S.Y., Wang, Y.J., and Wang, P., (2011). "Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn." *Environment International*, 37(2), 1098–1104.
- [96] Sezer Tuncsoy, B., Tuncsoy, M., Gomes, T., Sousa, V., Teixeira, M.R., Bebianno, M.J., and Ozalp, P., (2019). "Effects of copper oxide nanoparticles on tissue accumulation and antioxidant enzymes of *Galleria mellonella* L." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102, 341–346.

- [97] Joris, F., Valdepérez, D., Pelaz, B., Soenen, S.J., Manshian, B.B., Parak, W.J., De Smedt, S.C., and Raemdonck, K.,(2016). “The impact of species and cell type on the nanosafety profile of iron oxide nanoparticles in neural cells.” *Journal of Nanobiotechnology*, 14:69.
- [98] Calder, P.C., Kulkarni, A.D., Nutrition, Immunity, and Infection. CRC Press; 2017
- [99] Samartín, S., and Chandra, R.K., (2001). “Obesity, overnutrition and the immune system.” *Nutrition Research*, 21(1-2), 243-262.
- [100] Chapman, R.F., Simpson, S.J., Douglas, (2013). *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press 2013.
- [101] Thompson, S.N., (2003). “Trehalose—the insect “blood” sugar.” *Advances in Insect Physiology*, 31, 205-285.
- [102] Chapman RF, Douglas AE, Siva-Jothy MT, Simpson SJ(2013). “Circulatory system, blood and the immune system.” *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press.
- [103] Lemaitre, B., and Hoffmann, J.,(2007). “The host defense of *Drosophila melanogaster*.” *Annual Review of Immunology*, 25, 697-743.
- [104] Blow, F., Douglas, (2019). “The hemolymph microbiome of insects.” *Journal of Insect Physiology*, 115, 33-39.
- [105] Moret, Y., and Schmid-Hempel, P.,(2000). “Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers.” *Science*, 290(5494), 1166-1168
- [106] Park, H.J., Kim, E.J., Tai, Y.K.,and Tai, H.P., (2003). “Purification of recombinant 30K protein produced in *Escherichia coli*, and its anti-apoptotic effect in mammalian and insect cell systems.” *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 466–471.