

T.C.

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEMİR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN *Galleria mellonella*
(L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın BİYOLOJİSİNE ve
HEMOSİTLERİNE ETKİSİ**

Tezi Hazırlayan

Ayşe Nazan ESKİN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Mart 2022

NEVŞEHİR

T.C.

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEMİR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN *Galleria mellonella*
(L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın BİYOLOJİSİNE ve
HEMOSİTLERİNE ETKİSİ**

Tezi Hazırlayan

Ayşe Nazan ESKİN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Mart 2022

NEVŞEHİR

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK danışmanlığında Ayşe Nazan ESKİN tarafından hazırlanan " **Demir oksit nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın biyolojisine ve hemositlerine etkisi**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** Tezi olarak kabul edilmiştir.

04/03/2022

JURİ

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Fatih Doğan KOCA

Üye: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Üye: Doç. Dr. Musa KAR

ONAY:

Bu tezin kabülü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Enstitü Müdür V.

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ayşe Nazan ESKİN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışmanım Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK Hocama,

Çalışmam süresince malzeme ve teknik bilgiler konusunda yardımlarını esirgemeyen Ör. Gör. Dr. Enver Ersoy ANDEDEN Hocama,

Çalışmamın böcek temini konusunda destek sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Ata ESKİN Hocama,

Tez yazım süresince karnımda olup, manevi destek sağlayan oğullarım Atakan Altay ESKİN ve Kıvanç Ural ESKİN'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından ABAP21F9 numaralı teşvik projesi ile desteklenmiştir. Destekleri için BAP birimine ayrıca teşekkür ederim.

DEMİR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
***Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın BİYOLOJİSİNE ve**
HEMOSİTLERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayşe Nazan Eskin

NEVŞEHİR HACİBEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2022

ÖZET

Bu çalışmada, manyetik demir oksit nanopartikülü (Fe_3O_4 NP)'nün bir deney model hayvanı olan büyük kovan güvesi *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) üzerindeki toksik etkileri araştırıldı. Çalışmada, *G. mellonella* larvalarına zorla besleme uygulaması yapılarak demir oksit NP'nin (0,4, 2, 10, 50, 250 μg /10 μl) konsantrasyonları son dönem larvalara verildikten sonra böceğin biyolojisine, hemosit sayısına, hemositlerde meydana gelen apoptotik, nekrotik ve mitotik indekslere, hemosit canlılığına ve mikronükleus oluşumuna etkileri araştırıldı. Sonuçlara göre; pupa gelişim süresinin ortalaması, 250 μg /10 μl demir oksit NP konsantrasyonuna maruz kalan larvalarda 2 μg /10 μl demir oksit NP konsantrasyonuna maruz kalan larvalara göre uzama göstermiştir. Artan Fe_3O_4 NP konsantrasyonun etkisiyle pupa ağırlığı ortalaması 250 μg /10 μl Fe_3O_4 NP konsantrasyonunda artış göstererek kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. 10 μg /10 μl Fe_3O_4 NP konsantrasyonuna maruz kalan bireylerin ortalama ergin gelişim süresi kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış göstermiştir. Hemosit sayısı ortalamaları, 10, 50 ve 250 μg /10 μl Fe_3O_4 NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvalarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma göstermiştir. Canlı hücre yüzdesi 10, 50 ve 250 μg /10 μl Fe_3O_4 NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvalarda kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma göstermiştir. Aynı konsantrasyonlarda (10, 50 ve 250 μg /10 μl Fe_3O_4 NP) apoptotik hücrelerin % durumları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, apoptotik hücre %'leri kontrol grubuna göre artış göstermiştir. 50 ve 250 μg /10 μl Fe_3O_4 NP konsantrasyonuna maruz kalan larvalardaki nekrotik hemosit hücre %'si artış kontrol grubuna göre önemli düzeyde gerçekleşmiştir.

Son olarak, 10 ve 50 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonlarında mikronükleus içeren hemositlerin %'leri kontrol grubuna göre artış göstererek istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Biyoloji, Demiroksit nanopartikül, Galleria mellonella, Hemosit, Mikronükleus.*

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Sayfa Adedi: 61



**EFFECTS of IRON OXIDE NANOPARTICLES on BIOLOGY and HEMOCYTES of
Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)
(Master Science Thesis)**

Ayşe Nazan ESKİN

NEVŞEHİR HACİBEKTAŞ VELİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE

March, 2022

ABSTRACT

In this study, the toxic effects of magnetic iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4 NP) on the Greater Wax Moth *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), an experimental model animal, were investigated. In the study, the concentrations of iron oxide NP (0.4, 2, 10, 50, 250 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) were administered to the last instar of *G. mellonella* larvae by force-feeding method and their effects on mitotic indices, hemocyte viability and micronuclei formations were investigated. According to the results; the mean pupal development time was prolonged in larvae exposed to 250 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ iron oxide NP concentration when compared to larvae exposed to 2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ iron oxide NP concentration. With increasing Fe_3O_4 NP concentration, the mean pupal weight increased at 250 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Fe_3O_4 NP concentration and was statistically significant compared to the control group. The mean adult development time of individuals exposed to 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Fe_3O_4 NP concentration increased significantly when compared to the control group.

The mean number of hemocytes showed a statistically significant decrease in larvae exposed to 10, 50 and 250 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Fe_3O_4 NP concentrations compared to the control group.

The percentage of viable cells showed a significant decrease in larvae exposed to 10, 50 and 250 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Fe_3O_4 NP concentrations when compared to the control group. When the % conditions of apoptotic cells were compared with the control group at the same concentrations (10, 50 and 250 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Fe_3O_4 NP), the % of apoptotic cells increased according to the control group.

The percentage of necrotic hemocyte cells in larvae exposed to the concentrations of 50 and 250 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Fe_3O_4 NP increased significantly compared to the control group. Finally, the percentage of hemocytes containing micronuclei increased at concentrations of 10 and 50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Fe_3O_4 NP compared to the control group and was found to be statistically significant.

Key words: *Biology, Galleria mellonella, Hemocyte, Iron oxide nanoparticle, Micronucleus.*

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Page Number: 70



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	I
TEZ BİLDİRİM SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	XI
RESİMLER LİSTESİ.....	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	XIII
1. BÖLÜM	
GİRİŞ.....	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Nanopartiküllerin Tarihi.....	2
2.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması.....	2
2.2.1. Karbon Bazlı Nanopartiküller.....	2
2.2.2. Seramik Nanopartiküller.....	3
2.2.3. Yarı İletken Nanopartiküller.....	3
2.2.4. Polimerik Nanopartiküller.....	3
2.2.5. Lipid Bazlı Nanopartiküller.....	3
2.3. Nanopartiküller ile Gerçekleştirilen Biyolojik Çalışmalar.....	3
2.4. Demir Oksit Nanopartikülü.....	5
2.4.1. Demir Oksit Nanopartikülü ile Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	6
2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	7
2.5.1. Ultraviyole (Mor Ötesi) ve Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-VIS).....	7

2.5.2. Zeta Potansiyeli Analizi	7
2.5.3. XRD (X-Işınımı Kırınımı) Analizi.....	8
2.5.4. BET (Yüzey Alanı) Analizi	8
2.5.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	8
2.5.6. Infrared (Kızılötesi) Spektroskopisi.....	8
2.6. Böceklerde Hemolenf ve Hemositler	8
2.6.1. Prohemosit	9
2.6.2. Plazmosit	9
2.6.3. Granülositler	9
2.6.4. Sferülosit	9
2.6.5. Önositoidler.....	10
2.7. Ülkemizde Böcek Hemositleri ile Yapılan Çalışmalar.....	10
2.8. Böcek Hemositlerinde Apoptoz ile İlgili Çalışmalar.....	11
2.9. <i>Galleria mellonella</i> L. 1758 (Büyük Balmumu Güvesi)'nin Biyolojisi.....	13

3. BÖLÜM

3.1. Materyal.....	15
3.1.1. <i>Galleria mellonella</i> L. 1758 (Büyük Balmumu Güvesi) Kültürünün Oluşturulması ve Devamının Sağlanması.....	15
3.1.2. Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	15
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Deneylede Kullanılması... 16	
3.2.2. <i>G. mellonella</i> (Büyük Balmumu Güvesi) Larvalarında Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin Ölümcül Konsantrasyon 50 ve 90 (LC ₅₀ ve LC ₉₀) Değerlerinin Belirlenmesi.....	17
3.2.3. Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin <i>Galleria mellonella</i> (Büyük Balmumu Güvesi)'nin Bazı Biyolojik Parametreleri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi... 18	
3.2.4. Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin <i>Galleria mellonella</i> (Büyük Balmumu Güvesi)'nin Hemosit Sayısına Etkisi	18
3.2.5. Mikronükleus Durumu ve Nekrotik-Apoptotik-Mitotik İndeksiler.....	19

3.2.6. İstatiksel Analiz.....	21
-------------------------------	----

4.BÖLÜM

Bulgular.....	22
---------------	----

4.1. Fe ₃ O ₄ Nanopartikülünün Karakterizasyonu.....	22
--	----

4.2. Fe ₃ O ₄ Nanopartikülünün Ölümcül Konsantrasyon 50 ve 90 (LC ₅₀ ve LC ₉₀) Değerlerinin Belirlenmesi.....	23
--	----

4.3. Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin <i>Galleria mellonella</i> Bazı Biyolojik Parametreleri Üzerindeki Etkileri.....	24
---	----

4.4. Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin <i>Galleria mellonella</i> 'nın Hemosit Sayısına Etkisi.....	25
---	----

4.5. Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin <i>Galleria mellonella</i> 'nın Hemositlerinde Mikronükleus Oluşumuna, Nekrotik, Apoptotik ve Mitotik İndekslere Etkisinin Belirlenmesi.....	26
---	----

5.BÖLÜM

TARTIŞMA.....	28
---------------	----

5.1. Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin <i>Galleria mellonella</i> Bazı Biyolojik Parametreleri Üzerindeki Etkileri.....	28
---	----

5.2. Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin <i>Galleria mellonella</i> 'nın Hemosit Sayısına Etkisi.....	30
---	----

5.3. Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin <i>Galleria mellonella</i> 'nın Hemositlerinde Mikronükleus Oluşumuna, Nekrotik, Apoptotik ve Mitotik İndekslere Etkisi...32	
---	--

SONUÇ.....	34
------------	----

KAYNAKLAR.....	36
----------------	----

TABLÖLAR LİSTESİ

- Tablo 4.1.** Fe₃O₄ nanopartiküllerinin XRD pik listesi.....22
- Tablo 4.2.** Demir oksit nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*'nın bazı yaşam parametreleri üzerine etkileri.....24
- Tablo 4.3.** Demir oksit Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*'nın hemosit sayısına etkisi (zorla besleme uygulamasından 96 saat sonra).....25
- Tablo 4.4.** Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*'nın hemositlerinde mikronükleus oluşumuna, nekrotik, apoptotik ve mitotik indekslere etkisi (zorla besleme uygulamasından 96 saat sonra).....27



RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. <i>Galleria mellonella</i> ' nın gelişim evreleri: yumurta (A), larva (B), pupa (C) ve ergin (D).....	14
Resim 3.1. Zorla besleme yöntemi (force-feeding) ile 10 µl iyonize suyun <i>Galleria mellonella</i> larvasına verilmesi.....	17
Resim 3.2. Neubauer hemositometresi sayım alanı.....	19
Resim 3.3. Neubauer hemositometreye yüklenen hemositler.....	19
Resim 4.1. Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin FESEM görüntüsü (150.000x).....	22
Resim 4.2. Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin XRD difraktogramı.....	23
Resim 4.3. Canlı, mitotik, nekrotik ve mikronükleus içeren hemosit hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri: a. Canlı hemosit hücresi, b. mitotik hemosit hücresi, c. apoptotik hemosit hücresi, d. nekrotik hemosit hücresi, e. mikronükleus bulunduran hemosit hücresi'dir.....	26

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

Bet: The Brunauer-Emmett-Teller

Dk: Dakika

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

Fe₃O₄ NP: Demir oksit nanopartikülü

IAA: İndol-3-asetik asit

LC₅₀: Lethal konsantrasyon 50

M: Molar

mg: Miligram

ml: Mililitre

Ort: Ortalama

NAC: n-acetylcystein

NFE: Nonifenol Etoksilat

NP: Nanopartikül

p-CPnfs: Bakır fosfat nanoçiçekleri

PNP: Polimer nanopartikül

PSP: Plazmatosit yayan peptid

SH: Standart Hata

Sn: Saniye

vb.: Ve benzeri

XRD: X-Işınımı Kırınımı

1. BÖLÜM

GİRİŞ

İçinde bulunduğumuz yüzyılda, teknolojik ve bilimsel gelişmelerin hızla artmasından dolayı, hayatımıza değişik kavramlar girmiştir. Bu kavramlardan nanopartikül (NP) ve nanoteknoloji son günlerde yaşamımızın önemli noktalarında yer almaktadır.

Günümüzde, bilim ve teknolojiadaki hızlı gelişmelerin ilgi uyandıran kısmı olan nanoteknolojinin yapıtaşları olan NP'ler, hayatımızın her alanına yerleşmiş durumdadır. Nanoteknoloji yeni bir alan ve birçok gelişmiş ülke tarafından önemli ve kritik olduğundan, büyük yatırımlar yapılmakta, araştırma merkezleri kurulmakta, konu üzerinde yapılan projeler desteklenmekte ve bu alanda uzman yetiştirilmeye çalışılmaktadır.

Dünya'da NP'lerin, insan ve çevre üzerindeki olumsuz etkileri bilinmemekte ve bundan dolayı sınırlı kullanılmaktadır. Kullanım alanları incelendiğinde genel olarak sağlık alanında, yer altı suyu ve hava temizliğinde, kozmetik sektöründe, tarım ilaçlarında, beyaz eşya sektöründedir. Bu kadar geniş yelpazede kullanımı mevcut olan NP'lerin önemi daha da artmıştır.

NP'ler içerisinde, bu yüksek lisans tez çalışmasında kullanmış olduğumuz, süpermanyetik NP olan demiroksit nanopartikülü (Fe_2O_3 NP); biyomedikal, çevresel ve tarımsal alanlarda kullanılmakta olup, özellikle süper paramanyetik özelliğinden de yararlanılmaktadır. Demir oksit NP'nin; manyetik soğutma, anti kanser ilaçlarının manyetik kontrollü taşınmasında, manyetik kaplamalarda, optik cihazlarda, dedektörlerde, mikrodalga gibi cihazlarda kullanımı mevcuttur. Her zaman karşılaştığımız söz konusu bu NP'ler ile ilgili gerçekleştirilen toksikoloji çalışmaları önem arz etmektedir. Model deney organizması olarak kabul edilen *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) kullanılarak yapılan bu araştırmanın, gelecekte bu alanda çalışacak olan araştırmacıların söz konusu NP ile gerçekleştirecekleri araştırmalara yön verebileceği öngörüsündeyiz. Ayrıca manyetik demir oksit NP'nin, *G. mellonella*'nın bazı biyolojik parametrelere etkisine, hemosit sayısına, hemositlerinde neden olduğu; apoptotik, nekrotik ve mitotik indekslerine ve mikronükleus oluşumuna etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya ülkemizde rastlanmamıştır. Bu sebepten dolayı, gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışma bilimsel literatüre katkı sağlamak açısından, gelecekteki araştırmalara ve araştırmacılara yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

2.BÖLÜM

Genel Bilgiler

2.1. Nanopartiküllerin Tarihi

Yunancada 'nano' kelimesi, Türkçe olarak cüce anlamına gelmektedir [1]. Nanometre kelimesi metrenin milyarda biri anlamına gelmekte olup, "nm" kısaltmasıyla gösterilir [2].

Nanoteknolojinin kelime anlamı, tanecik boyutu 0,1 nm-100 nm arasındaki, küçük tanecik yapıları inceleyen teknoloji alanına verilen isimdir [3]. Richard Adolf Zsigmondy 1914 [4] yılında yaptığı çalışmada, karanlık alan ultramikroskopisini kullanarak, tek renkli ışık boyutundan daha ufak parçacıkları (1/1.000.000 mm) gördü ve bu parçacıklara "nanopartikül" adını verdi.

Nanoteknolojinin kavramsal temelleri ilk kez 1960 yılında fizikçi Richard Feynman [5] tarafından "Dipte bol miktarda yer var" dersinde açıklanmıştır. Feynman'ın açıklamasından 15 yıl sonra Japon bilim insanı Norio Taniguchi, nanoteknoloji terimini açıklamış ve adını bilim dünyasına kazandırmıştır. Nanoteknolojinin bilim dünyasında ün kazanması Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'nden (MIT) Eric Drexler'in, 1986 [6] yılında yazdığı "Yaratılış Motorları: Nanoteknolojinin Gelen Çağı" başlıklı kitabıyla mümkün olmuştur. Gelişen teknolojiyle birlikte 1991 yılında bir başka Japon bilim insanı olan Sumio Iijima'nın [7] karbon nanotüpleri bulunmasıyla, nanoteknoloji başka bir boyuta taşınmıştır.

NP'lerin,1914 yılında ismi konulsa bile, gezegenimizin atmosferinde her zaman var olduğu bilinmektedir. NP'ler gezegende hazır olarak kendiliğinden veya doğal süreçlerle de oluşabileceği gibi insan kaynaklı kimyasal süreçler ve biyosentez sonucunda da oluşmaktadır. Kimyasal kaynaklı NP'ler sonsuz çeşitliliktedir [4].

2.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Kimyasal, biyosentez ve doğal yollarla oluşan NP'ler, morfolojilerine, boyutlarına ve kimyasal özelliklerine göre kategorilere ayrılır [8]. Bunlar aşağıda alt başlıklar halinde açıklamaları ile birlikte verilmiştir.

2.2.1. Karbon Bazlı Nanopartiküller

Karbon bazlı NP'ler; fullerenler ve karbon nanotüpler (CNT'ler)'dir. Fullerenler, küresel yapıda olup, elektrik iletkenlikleri yüksek olduğundan ticari anlamda önemlidir [9]. Karbon nanotüpler (CNT) tüp şeklinde olup, tek duvarlı (SWNT), çift duvarlı (DWNT) ve çok duvarlı (MWNT) olarak sınıflandırılmaktadır [7-10].

Doğa, kendi bünyesinde yüksek miktarda çeşitli metaller barındırmaktadır. Metal NP'lerin üretilmesindeki ana amaç, toksik yapıda olan metallerin toksik etkisini azaltmaktır [11-12]. Metal NP'ler; altın (Au), gümüş (Ag), bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), titanyum (Ti), alüminyum (Al), kobalt (Co), paladyum (Pd), kadminyum (Cd)'dur. Metal NP'lerin farklı özellikleri olması nedeniyle, tarım, tıp, tekstil, elektrik sanayinde, kozmetik sanayinde, ilaç sanayinde ve biyokimyasal sensörlerde kullanışlı ve çevre dostudur [12-13]. Her NP'nin kullanım alanı oldukça farklıdır. Örnek verecek olursak, platinum, selenyum ve demir NP'ler: kanser mücadelesinde, gümüş ve bakır NP'ler: mikrop mücadelesinde, çinko oksit NP'ler: kozmetik sektöründe, altın NP'ler ise biyosentezde kullanılmaktadır [14].

2.2.2. Seramik Nanopartiküller

Seramik NP'ler, birçok farklı yöntemle üretilmektedir. Bunlar; sol-jel kimyası, mikto-emülsiyon, hidrotermal, solvo-termal, şablon, biyomimetik, sentez vb. yöntemlerdir [15-16]. Seramik NP'ler, yüksek ısı ve kimyasal dirence sahip olduğundan, fotokataliz, boyaların fotodegradasyonu ve görüntüleme uygulamalarında kullanılmaktadır [8].

2.2.3. Yarı İletken Nanopartiküller

Yarı iletken nanokristaller, boyuta göre ayrılabilen optik özelliklere sahip olup, elektronik geçişlere sahiptir. Yarı iletken nanokristaller polarize edilerek, optik ve elektronik cihazlarda kullanılmaktadır [8, 17-18].

2.2.4. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik NP'ler, literatürde polimer nanopartikül (PNP) olarak da kullanılmaktadır. Organik bazlı NP'ler olup, nano-küre ve nano-kapsül şeklinde dirler [8].

2.2.5. Lipid Bazlı Nanopartiküller

Lipid bazlı NP'ler, 10 ile 1000 nm arasında değişmektedir. İlaç taşıyıcı ve dağıtımında ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır [8].

2.3. Nanopartiküller ile Gerçekleştirilen Biyolojik Çalışmalar

Rajawat ve Qureshi (2012) [19], gümüş NP'lerini, iki standart antibiyotik olan ampilin ve gentamisin ile kombine ederek *Salmonella typhi* üzerinde denemişlerdir. Antibiyotiklerin bakteri üzerindeki antibiyotik aktiviteleri gümüş NP varlığında artmıştır. Gentamisin ile

karşılaştırıldığında ise test suşlarına karşı en yüksek etki ampisilinde gözlenmiştir.

Armstrong ve ark. (2013) [20], *Drosophila melanogaster* üzerinde gümüş NP'nü uygulayarak böcek üzerindeki etkilerini gözlemlemiştir. Bu böcek türünün kütiküllerinde, NP toksisitesi nedeniyle melanin pigmentinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca böceğin dokusunda Cu-Zn SOD (Süpersokit Dismutaz) gibi bakır bağımlı enzimlerin aktivitesinin azaldığı da bulunmuştur.

Çiftçi ve ark. (2013) [21], MCF-7-hücrelerinde (insan göğüs adenokarsinoma hücre hattı) gümüş NP'nün, sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkilere neden olduğunu tespit etmişlerdir. Gümüş NP'nün doza bağımlı olmak üzere, yüksek konsantrasyonlarda daha az apoptotik daha fazla nekrotik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Hassani ve ark (2015) [22], nane bitkisi (*Mentha piperita* L.) üzerinde demir, potasyum ve çinko nano gübrelerini uygulamışlardır. Uygulama sonucunda nano gübrelerin nane (*Mentha piperita* L.) bitkisinin boyu, dal sayısı, yaprak ve gövde yaş ağırlığında artışa neden olduğu saptanmıştır.

Madhiyazhagan ve ark. (2015) [23], *Sargassum muticum* (su yosunu) kullanarak gümüş NP elde etmişler ve gümüş NP'nün düşük dozlarının sivrisik kontrolünde etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucuna göre gümüş NP'nün düşük dozlarının sivrisinekler üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Zorlu (2016) [24], farklı konsantrasyonlarda (100, 500, 1000, 3000 ve 5000 ppm) titanyum dioksit NP içeren besin ile beslenen *G. mellonella* üzerine etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonucunda maruziyetle doğru orantılı olarak deney grupları ile kontrol grupları arasında larval ve pupal gelişme süresinin, pup ve ergin ağırlıklarının, erkek ergin yaşam süresinin uzunluğu ile ilgili olarak önemli toksik etkiler saptanmış, son olarak erginde morfolojik anormallik yüzdesinin arttığını da belirlemiştir.

Meng ve ark. (2017) [25], *Bombyx mori* böceğini farklı konsantrasyonlarda gümüş NP ile besleyerek, büyüme ve yağ proteinlerine etkisini araştırmıştır. NP'lerin düşük konsantrasyonlarının (<400 mg/L) büyüme ve kokon ağırlığında artışa neden olduğu, yüksek konsantrasyonlarının (\geq 800 mg/L) ise böceğin ağırlığını arttırmasına rağmen ölümlere neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada, gümüş NP oksidatif strese karşı böceğin direncini düşürerek, hücre apoptozuna karşı etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, hücre nekrozunu da tetiklediğini bildirmişlerdir.

Eskin ve ark. (2019) [26], çinko oksit NP kullanarak *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)

üzerinde iki farklı sayım yöntemiyle (otomatik hücre sayar ve ışık mikroskopunu ayrı ayrı kullanmak suretiyle) böceğin hemolenf hücre sayısına olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucuna göre, denenen nanopartikül konsantrasyonları (0,5, 1, 2,5, 5 µg/10 µl) toplam hücre sayısını önemli düzeyde etki etmemiştir. Ancak ölü hücre yüzdesi kontrol grubuna göre önemli ölçüde artmıştır.

Durular (2019) [27], farklı konsantrasyonlarda (10000, 25000, 50000 ve 100000 ppm) alüminyum klorür ile beslenen *G. mellonella*'da, apoptotik indeks, mitotik indeks, mikronükleus, enkapsülasyon, melanizasyon ve nodülasyon durumlarını incelemiştir. İnceleme sonucunda doza bağlı olarak apoptotik ve nekrotik hücrelerin sayısında artış bulmuştur. Ayrıca larvaların hemositlerinde mikronükleus oluşumu ve mitotik indeks oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark olmadığını tespit etmiştir. *G. mellonella* larvalarında enkapsülasyon, melanizasyon ve nodülasyon davranışlarında artış olduğunu bulmuştur.

Eskin ve ark. (2020) [28], Bakır oksit NP'yi farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 150 µg/10µl/larva) *G. mellonella* larvasına zorla besleme yoluyla vermişlerdir. 72 saat sonra bakır oksit nanopartikülünün apoptotik, nekrotik ve mitotik hücre sayısında artışa neden olduğu gözlemlenmiştir.

Taştan ve ark. (2020) [29] demir oksit (γ -Fe₂O₃, α - Fe₂O₃) NP'nin suda yaşayan türler için oldukça toksik olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında sucul türler olan *Chlorella* sp. ve *Daphnia magna* üzerinde demir oksit NP'leri olan γ -Fe₂O₃ ve α - Fe₂O₃ 'ün farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 100, 250, 500 ve 1000 mg/L) etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda (γ -Fe₂O₃, α - Fe₂O₃) konsantrasyonlarının, artan konsantrasyonu ile mikroalgal büyümesinin azaldığı, ancak önemli bir toksik etki gözlenmemiştir.

2.4. Demir Oksit Nanopartikülü

Manyetik partiküller arasında en çok tercih edilen NP, manyetik demir oksittir. Nano boyuttaki demir oksit, manyetik özelliklerinden dolayı kataliz ve biyotıp gibi birçok alanda kullanıldığından, son dönemde kullanımı alanı arttırılmıştır [30]. Nano boyuttaki demir oksitin, parçacık boyutu genel olarak 1-100 nm arasında olup, 40 yıldır in-vitro tanı çalışmalarında yer almaktadır [31-32]. Özellikle manyetik özellikleri arasında ufak farklılıkları olan, maghemit (γ -Fe₂O₃) ve manyetit (Fe₂O₃) nano boyuttaki demir oksitin, bilimsel çalışmalarda daha çok yer aldığı bilinmektedir [33-32].

2.4.1. Demir Oksit Nanopartikülü ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

2012 yılında Behera ve arkadaşları [34] sentezledikleri demir oksit NP'yi (Fe_3O_4 NP)'nü bazı gram negatif ve gram pozitif bakterileri üzerinde denemişlerdir. Yapılan çalışmada kontrol grubuna standart antibiyotik neomycin ($30 \mu g/disc$) uygulanmış, deney grubuna ise demir oksit NP 50 mg/ml dozunda uygulanmıştır. *Shigella flexneri* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin demir oksit NP'nin uygulandığı suşlarda inhibisyon zonu küçülmüştür (18 ± 0.35 'ten 0 ± 0.0 'a). *Staphylococcus aureus*, *Bacillus brevis*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus aureus*, *S.epidermidis*, *Escherichia coli* bakterilerinin yerleştiği suşların inhibisyon zonlarının demir oksit NP uygulaması yapılan deney gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir.

Tang ve Lo'nun 2013 [35], çevre kirliliğine neden olan bazı etmenlerin, demir oksit NP kullanılarak atık sulardan arındırıldığını belirtmişlerdir.

Askary ve ark (2016) [36], bitkilerin topraktan demir elementini zor aldığından yola çıkarak yaptığı bir çalışmada demir oksit NP kullanmıştır. *Catharanthus roseus* L. bitkisine, nano demir oksit gübresini farklı konsantrasyonlarda ($0, 5, 10, 20, 30$ ve $40 \mu M$), 70 gün süresince vermişlerdir. 70 günün sonunda bitkide fotosentetik pigment ve toplam protein içeriğinin arttığı görülmüştür.

Murugan ve arkadaşlarının 2018 [37] yılında yaptığı bir çalışmada, *Ficus natalensis* bitkisinden Fe^0 NP, kimyasal yöntemlerle de Fe_2O_3 NP'yi sentezlemişlerdir. Sentezlenen NP'ler bir sivrisinek türü olan *Culex quinquefasciatus* ve bir lepistes türü *Poecilia reticulata*'nın yer aldığı 5 L klorsuz su içerisine ilave edilmişlerdir. *P. reticulata* çözeltili içerisine ilave edilmeden önce 24 saat aç bırakılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda *P. reticulata*'nın avlanma yeteneği artmış, *C. quinquefasciatus*'a ait larva ve pupa sayıları not edilmiş olup, denenen NP'lerin larvasidal ve pupasidal etkisini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu yüzden Fe^0 ve Fe_2O_3 NP'leri ile yeni ve etkili pestisit geliştirilebileceği kanısına varılmıştır.

Sankaralingam ve Kadirvelu 2017 [39] yılında Su Kabağı (*Lagenaria siceraria*) bitkisi kullanarak, demir oksit NP'lerini (Fe_3O_4 NP) sentezlemişlerdir. Sentezlenen Fe_3O_4 NP'ler, *S. aureus* ve *Escherichia coli* bakterileri üzerinde denenmiştir. Çalışma sonucunda *S. aureus*'un inhibisyon zonunun 14 mm 'den 8 mm 'ye azaldığı, *E. coli*'nin inhibisyon zonunun 17 mm 'den 10 mm 'ye düştüğü görülmüştür. Böylece, demir oksit NP'lerin antimikrobiyel özelliği tespit edilmiştir [38].

Gaharwar ve arkadaşları 2017 yılında Fe_2O_3 NP'leri'ni sıçanlar üzerinde denemişlerdir. Deney sonucunda sıçanların dalak lenfositleri üzerindeki sitotoksisiye, oksidatif strese ve DNA

hasarına neden olduğu tespit edilmiştir.

Praveen ve arkadaşlarının 2018 yılında [40] Hardal Otu (*Brassica juncea* L.) üzerinde yaptığı bir çalışmada, demir oksit NP (Fe_3O_4) ve arsenik (As) birlikte kullanıldığında, kök-sürgün büyümesi, klorofil, karotenoid ve protein içeriğini arttırdığını, antioksidan, enzim ve stres modülatörlerinin miktarlarını da azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca Hardal Otu'nun metal stresinin üstesinden geldiğini de ortaya koymuşlardır.

Uysal ve ark. (2019) [41], su ortamında ksenojen ve östrojenik mikro kirleticiler oluşturan Nonifenol Etoksilatların (NFE) pektin ile kaplanmış demir oksit NP kullanarak su ortamından giderilimini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda optimum koşullarda (pH 7.0, 4 g/L Pektin- Fe_3O_4 derişimi) pektin ile kaplanmış demir oksit NP kullanarak %62 oranında NFE giderim verimi elde etmişlerdir.

2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

NP'lerin, yüzey özelliklerinin tespit edilmesinde yüzey morfolojisi, kimyasal bileşimi ve uzamsal dağılımı gibi yüzey karakterizasyon teknikleri kullanılır. Bu teknikler sırasıyla;

2.5.1. Ultraviyole (Mor Ötesi) ve Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-VIS)

Ultraviyole ve görünür bölgede meydana gelen absorpsiyon, bağ elektronlarının uyarılmasından dolayı olmaktadır. Absorpsiyon piklerinin dalga boyları, bağların şekilleriyle ilgilidir. Bu teknik, esas olarak hazırlanan çözelti tarafından emilen ve saçılan ışığı ölçmek amaçlı kullanılan tekniktir. NP'ler, optik özelliğe sahiptir. NP'lerin, boyut, şekil, konsantrasyon, aglomerasyon ve nanopartiküllerin yüzeye yakın kırılma indeksi UV-VIS ile karakterize edilip, incelenmektedir [42].

2.5.2. Zeta Potansiyeli Analizi

Esas olarak zeta potansiyeli net yükün ölçüsüdür [42-43]. Nano-parçacık ile sıvı arasındaki itme-çekme kuvvetidir. Aynı yükteki parçacıklar iter, farklı yükteki parçacıklar birbirine çekmektedir. Zeta potansiyel analizi ile taneciklerin yük durumlarına göre birbirlerine olan ilgisi test edilmektedir.

2.5.3. XRD (X-Işınımı Kırınımı) Analizi

Kristallerin atomlarının geometrik düzeni, aralarındaki mesafe, kristalografik yapısı ve elemental bileşimleri hakkında bilgi edinmek için dalga boyu sabit X ışınları ve X ışınları tüpleri kullanılan tekniğe XRD (X-Işınımı Kırınımı) tekniği denilmektedir. Kristallerin atom dizilimleri arasındaki uzaklığı belirleyen bir tekniktir [42-43].

2.5.4. BET (Yüzey Alanı) Analizi

The Brunauer-Emmett-Teller (Bet) yüzey alanı teorisi olarak da adlandırılmaktadır. Bu analiz yönteminde; granül ve toz halindeki katıların gaz adsorpsiyonu yardımı ile yüzey alanını belirlemektedir [42-43].

2.5.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Numune yüzeyine odaklanan, yüksek enerjili elektron demetiyle yüzeyin taranmasıdır. Taranma işlemi elektron mikroskobu ile gerçekleştirilmektedir. Elektronlar numune içerisindeki atomlarla etkileşime girerek sinyaller üretir. Oluşan sinyaller bilgisayar ekranına aktarılır ve görüntü elde edilir [42].

2.5.6. Infrared (Kızılötesi) Spektroskopisi

Kızılötesi spektroskopisine titreşim spektroskopisi adı verilmektedir. Infrared spektroskopisi ile kızılötesi ışınları moleküllerin titreşim hareketleri tarafından absorblanır. Moleküllerin arasında dönme ve titreşim düzeyleri arasındaki geçişleri sağlanmaktadır [42].

2.6. Böceklerde Hemolenf ve Hemositler

Çok hücreli hayvanlar doğal ve edinsel bağışıklığa sahip olurken, böcekler sadece doğal bağışıklık sistemine sahiptir [44]. Böceklerde bulunan doğal bağışıklık sistemi, hücresel ve humoral olarak ikiye ayrılmaktadır. Humoral efektif moleküller arasında anti-mikrobiyel peptitler bulunmaktadır. Bu peptitler bakteriyel ve fungal patojenleri yok etmektedir. Humoral efektif moleküller yağ cisimciği, hemositler, orta bağırsak, epidermis ve çeşitli dokular tarafından üretilmektedir [44-45-46].

Bakteri ve fungus gibi patojenler çeşitli hemositler tarafından fagosite edilirken, büyük organizmalar (parazitoit, metazoan parazit) enkapsüle edilir. Böceklerin ürettikleri çeşitli hemositlerin farklı görevleri vardır. Bu hemositler aşağıda alt başlıklar halinde verilmiştir.

2.6.1. Prohemosit

Hemolenfteki temel hücreye verilen isimdir. Hücrede tüm hücreyi kaplayan çekirdek ve küçük bir stoplazmik bölge bulundurmaktadır [44].

2.6.2. Plazmosit

Genel olarak küçük hücreler olup, küresel veya ince-uzun stoplazmik genişlemeler sahip oval şekildedir. İnce-uzun stoplazmik genişlemelere sahip prohemosit tipine pseudopodia adı verilmektedir. Hemolenfte tek-tek veya grup halinde bulunmaktadır. Hemolenf içerisinde en fazla bulunan hücre tipidir. Plazmositler, yabancı yüzeylere yapışarak fagosite eder ve kapsül oluşturur [44-47].

2.6.3. Granülositler

Hemolenf prepatlarında sayıca fazla olup, toplam hemosit popülasyonunun %30-65 arasındadır [48-49]. Granülositler yuvarlak, küçük bir çekirdeğe ve asidofilik bir sitoplazmaya sahiptir [49]. Stoplazmaları granüllü endoplazmik retikulum, golgi aygıtı, vezikülleri ve organeller barındırmaktadır [50]. Granülositleri ayırt ederken, granüllerim membrana bağlı olmasıyla ayırt edilmektedir. Granülositler yabancı yüzeylere yapışarak, fagosite etme özelliği vardır [47-51]. Yabancı cismi fagozite eden granülositler, plazmosit yayan peptid (PSP) salgılamakta, plazmositleri harekete geçirerek sitokin salgılamakta, plazmositler üst üste binerek kapsülleri oluşturur [52].

2.6.4. Sferülosit

Sferül hücreler (sferülositler); büyüklükleri 12-18 µm boyutunda, hareketsiz hücreler olup, yuvarlak veya oval şekillidir. Küresel yapıları sayesinde tanınmaktadır [53]. Sferülositlerin bağışıklık sistemindeki görevleri henüz bilinmemektedir [54-55].

2.6.5. Önositoidler

Önositoidler; büyüklükleri 54 µm'yi bulan yuvarlak veya oval şekilli hücreler olup, sitoplazmalarında çok sayıda ribozom bulunurken, diğer organelleri az gelişmiştir [56-57-58]. Lepidopterlerde bulunan hemositler içerisinde en büyüğü olmakla birlikte, *G. mellonella* hariç hemen lizize uğrayan hücrelerdir [44, 59-60].

2.7. Ülkemizde Böcek Hemositleri ile Yapılan Çalışmalar

Kurt (2013) [61], gerçekleştirdiği bir çalışmada farklı deltamethrin konsantrasyonlarını (5, 20, 50, 100 ve 150 µl) *G. mellonella*'nın 24, 48, 72 ve 96 saatlik periyotlarla hemositleri üzerine etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonucunda ilk 72 saatlik periyotlarında toplam hemosit sayısında 50, 100 ve 150 µl konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre azalma gözlemlenirken, 96. saatte aynı konsantrasyonların sadece 100 ve 150 µl'de artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda uygulanan 100 ve 150 µl konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemostilerinde mikronükleus oluşumunda artışa neden olduğu belirlenmiştir.

Yılmaz (2013) [62], 27 ± 1 °C sıcaklık, % 60 ± 5 nispi nem ve karanlık şartlarında *G. mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae)'nın besinine farklı dozlarda (100000, 200000 ve 300000 ppm) alimünyum klorür eklemiştir. Deneme 4 farklı (alimünyum klorürün 3 farklı dozu ve kontrol) karakterden oluşmuştur. Deney sonucunda, deney grubu bireylerinin larval ve pupal gelişim sürelerinin, ergin ömür uzunluğunun kontrol grubu bireyelerine göre azaldığı belirlenmiştir. Deney ve kontrol grubundaki bireylerde larva, pupa ve ergin ağırlıklarının, gelişim oranlarının, larval hemosit sayısının ve ergin morfolojisinin istatistiksel olarak aynı olduğunu, alimünyum klorürden etkilenme durumunun ise olmadığını tespit etmiştir.

IAA, oksin görevi gören bir hormondur. Çelik ve ark. (2017) [63], tarımsal verimi ve kaliteyi arttırmak amacıyla kullanılan bitki gelişim düzenleyicisi olan indol-3-asetik asit (IAA)'ın böcekler üzerindeki etkilerini araştırmıştır. 2017 yılında yapılan bu çalışmada IAA'nın, *Achroia grisella* Fabr. (Lepidoptera: Pyralidae) larva döneminin hemositleri üzerinde etkileri araştırılmıştır. Değişik konsantrasyonlarda (2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ppm) IAA verilen *A. grisella*'nın hemosit tipleri, apoptotik ve mitotik indeks oranları tespit edilmiştir. Uygulanan tüm dozlarda hemosit sayılarında artış gözlemlenirken, hemosit tiplerinde farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak hemosit sayısında, mitotik ve apoptotik indeks oranlarında farklılıklar gözlemlenmiştir.

Yücel 2017 [64], imidaklopridin subletal farklı dozlarının (0,25, 0,50, 0,75 ve 1.00 µg) *G.*

mellonella'nın 24, 48, 72 ve 96 saatlik periyotlarda toplam hemosit sayısı üzerine etkilerini araştırmıştır. Deney sonucunda, deney grubundaki hemosit sayılarının kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlenmiştir.

Gwokyalıya ve Altuntaş'ın 2019 [65] yılında yaptığı çalışmada model deney organizması olarak kabul edilen *G. mellonella*'nın son dönem larva dönemine zorla besleme yöntemiyle farklı dozlarda borik asit konsantrasyonunu (78,125-10.000 ppm) uygulamışlardır. Denemede 4 farklı karakter (borik asitin üç farklı dozu ve kontrol) yer almıştır. Borik asit uygulanan deney grubunda böceğin larval gelişiminde, granülosit ve sferlosit sayılarında kontrol grubuna göre artış gözlemlenmiştir. Deney grubunda pupa ve ergin ağırlığında, pupa gelişim sresinde, ergin ömründe kontrol grubuna göre azalmalar gözlemlenmiştir. Mitotik indeks ise kontrol grubuna göre değişiklik göstermemiştir.

Köse (2019) [66] çalışmasında zebularinin (antitümör baskılayıcı, inhibitör ajanı) *G. mellonella* ve pupa endoparazitoidi *Pimpla turionellea* (L.) 'nın yaşam döngüsü ve konak hemositlerine etkisini araştırmıştır. Çalışma iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamasında deney grubuna zebularinin farklı dozları (0,25mg/ml, 1mg/ml, 4mg/ml, 8 mg/ml, 16 mg/ml, 32mg/ml) *G. mellonella*'nın (0.21 ± 0.01 g) larvalarına 10 µl, kontrol grubuna 10 µl saf su Hamilton enjektör ile verilmiştir. İkinci aşamasında aynı dozlar uygulanmış ve *G. mellonella*'nın pupa evresinin bireyleri, endoparazitoid olan *P. turionellae* ile parazitlenmiştir. Deney sonucunda zebularinin *G. mellonella* ve *Pimpla turionellea* organizmalarının gelişim süresini uzattığı ve yaşam süresini kısalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca *G. mellonella*'nın hemosit, granülosit ve plazmosit sayılarının deney gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı, nositoid sayısının deney grubunda kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir.

2.8. Böcek Hemositlerinde Apoptoz ile İlgili alışmalar

Apoptoz teriminin ilk tanımını 1972 yılında, Kerr ve arkadaşları tarafından bir makalede tanımlanmıştır. Hayvansal hücrelerde mitoz olayı gerçekleşirken, hücresel anormallikler meydana gelmektedir. Oluşan hücresel anormallikler, düzenleyici genler yardımıyla tespit edilmesi sonucunda, programlanmış hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Bu olaya apoptoz adı verilmektedir [67-69].

Programlı hücre ölümü olan apoptoz, son yıllarda önemli bir araştırma konusu olmuştur. Yine son yıllarda kanser hücrelerinin tedavisinde farklı ajanlar ve ilaçlar kullanılmaya başlanmıştır. Söz konusu çalışmalarda, kanser hücreleri farklı ajan ve ilaçlarla apoptoza yönlendirilmektedir. *G. mellonella* besinine farklı konsantrasyonlarda İndol-3-asetik asit (IAA) ilave edilerek,

enjeksiyon yoluyla *G. mellonella*'nın larva dönemine verilmiştir. IAA besini ile yetiştirilen *G. mellonella*'nın pupa döneminden yetişen *P. turionellae* larvalarında IAA'nın farklı dozlarındaki apoptotik hücre sayıları incelenmiştir. Deney sonucunda erken apoptotik hücre sayısı 100 ppm dozunda, geç apoptotik hücre sayısı 50, 1000 ve 10000 ppm dozlarında artış gözlemlenmiştir [55].

G. mellonella larvalarına, bitki büyüme düzenleyicisi olan giberellik asitin (GA_3) farklı dozlarının uygulandığı bir çalışmada, geç apoptotik hücrelerin oranı, kontrol grubuna göre 200 ppm'den yüksek dozlarda artış göstermiştir [70].

Eskin ve Bozdoğan'ın 2021 [71] yılında yaptığı bir çalışmada 38 nm boyutlu, CuO NP'ler farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 150 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ /larva), dördüncü dönem ($100 \pm 20\ \text{mg}$) *G. mellonella* larvalarına, ağız yoluyla zorla besleme tekniği ile uygulamışlardır. Uygulamadan 24 ve 72 saat sonrasında, toplam hemosit sayısı tüm konsantrasyonlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde bir değişiklik göstermemiştir. Canlı hemosit oranı, 24. ve 72. saatlerde 50, 100, 150 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ bakır oksit konsantrasyonlarında önemli düzeyde kontrole grubuna göre azalma göstermiştir. Mitotik ve mikonükleus içeren hücrelerin yüzdesinde 24. saatte, 150 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ bakır oksit NP konsantrasyonunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış göstermiştir. 100 ve 150 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ bakır oksit NP konsantrasyonunda 72. saatte apoptotik hemosit sayısındaki artış daha yüksek bulunmuştur. Son olarak nektorik hemositlerin yüzdesinde 72. Saatte ve 150 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ bakır oksit NP konsantrasyonunda önemli düzeyde artış belirlenmiştir.

Birçok alanda kullanılan farklı boyutlarda çinko oksit NP'leri, omurgasız deney modeli organizması olan *Bombyx mori* larvaları üzerinde denenmiştir. Deney sonucunda ZnO NP'lerinin apoptozu indüklediği, apoptotik hücre ölümünde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca NAC (n-acetylcystein)'e önceden tabi tutulmuş *Bombyx mori* larvalarında, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdesinde azalma gözlemlenmiştir [72].

Gümüş NP'ler, hijyen, kişisel bakım ve sağlık ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mantar çeşidi olan "*Aspergillus tubingensis*" kullanılarak, gümüş NP sentezlenmiştir. Sentezlenen gümüş NP'ler, *G. mellonella* larvaları üzerinde denenmiştir. Deney sonucunda, *G. mellonella* hemositlerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir. Bundan dolayı, gümüş NP'lerinin farklı biyomedikal durumlarında uygulanabileceği anlaşılmıştır [73].

2.9. *Galleria mellonella* L. 1758 (Büyük Balmumu Güvesi)'nin Biyolojisi

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Lepidoptera

Üstfamilya: Pyraloidae

Familya: Pyralidae

Altfamilya: Galleriinae

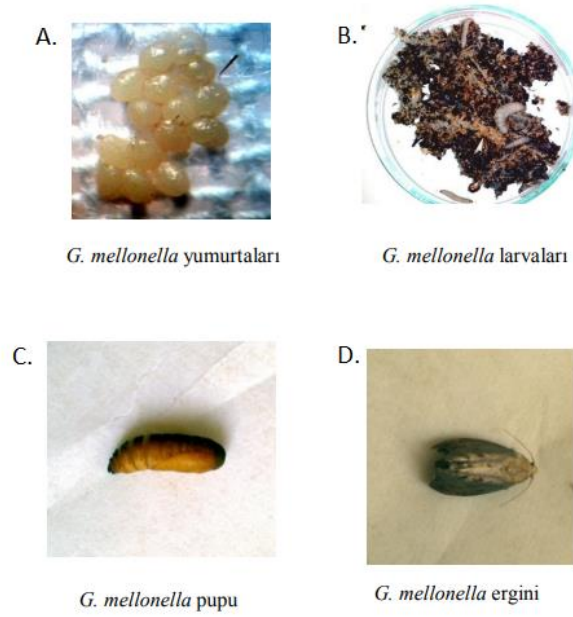
Cins: *Galleria* Fabricius, 1798

Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)

Büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), bal arısı *Apis mellifera* L. ve *A. cerana* Fabricius 'nın bulunduğu yerlerde kovanlardaki peteklere ciddi zararlar vermektedir. Bu zararlar sırasıyla, zararlının larva dönemi bal arılarının kuluçka ve mühürlenmemiş petek hücre kenarlarına, peteğin orta tabakasına yuva yapmakta ve buradan beslenmektedir. Bu sebeplerden dolayı, bal arısı (*A. mellifera* ve *A. cerana*) sayısında azalma gözlenmektedir [74].

G. mellonella hızlı büyüme, yüksek doğurganlık, boyut olarak ufak olması, kısa yaşam döngüsüne sahip olmasından dolayı aynı zamanda uygun bir deney model organizmasıdır. Ayrıca larvaların bağışıklık savunması çok güçlü olduğundan memeli bağışıklık modellerine de uygundur. Uygun bir model organizma olması özelliği ile zararlının larvaları ile yapılan çalışmalar artış göstermektedir [75-76].

G. mellonella'nın gelişim evreleri dört dönemden oluşmaktadır. Bunlar yumurta, larva, pupa ve ergin dönemleridir (Resim 2.1.).



Resim 2.1. *Galleria mellonella*'nin gelişim evreleri: yumurta (A), larva (B), pupa (C) ve ergin (D) [62].

Zararlıının ergin dönemi, yumurtalarını kovandaki çatlak ve yarıklara kümeler halinde bırakmaktadır. Yumurtalar krem-beyaz arası renkte, 0,45 mm boyutunda, 0,028 mg ağırlığında çıplak gözle görülemeyecek boyuttadır. Bırakılan yumurtaların canlı kalabilmesi için, ortam sıcaklığının 9 °C'nin altına düşmemesi gerekmektedir. Yumurtadan çıkan larvalar krem renginde olup, peteklerde tünel açarak beslenmektedir. Larva döneminin istediği sıcaklık 29-35 °C arasında olup, 15 °C'nin altında gelişim durmaktadır. İlerleyen larva döneminde koza örer ve prepupa dönemine girmektedir. Prepupa döneminden sonra pupa dönemine geçer. Pupa döneminden sonra, ergin bireyler oluşmaktadır. Oluşan ergin bireyler kahverengi-gri renkte olup, 1-3 hafta arasında dişiler, 2-4 hafta arasında erkek bireyler yaşam sürmektedir. Ergin dişiler, pupa döneminin bitiminden 4-10 gün sonra yumurtlamaya başlamaktadır. *G. mellonella* ergin döneminde beslenme yapmamaktadır. Bu yüzden ergin dönemi, arıların oluşturdukları muhlara zarar vermemektedir [77-80].

3. BÖLÜM

3.1. Materyal

3.1.1. *Galleria mellonella* L. 1758 (Büyük Balmumu Güvesi) Kültürünün Oluşturulması ve Devamının Sağlanması

Büyük Balmumu Güvesi'nin devamını sağlamak amacıyla, laboratuvar koşullarında in vitro (hazır) besin ortamı hazırlanmıştır. Yapay besi ortamı hazırlanırken, Avan ve Uğur (2019)'un [81] metodundan yararlanılmıştır. Hazır besi ortamı sağlamak amacıyla mısır unu, kepek, süt tozu, bal, gliserin, maya, öğütülmüş petek besinleri sırasıyla 4:4:2:2:2:1:3 oranlarında karıştırılmıştır. Hazırlanan besin, 1/3'ünü dolduracak şekilde 1 litrelik 20 adet cam kavanoz içerisine konulmuştur. Ardından Büyük Balmumu Güvesi yumurtaları, 1/3'ü besin bulunan kavanozlara ilave edilmiştir. Kavanoz ağızlarına 2 kat amerikan kumaşı lastik yardımıyla geçirilmiş ve kavanoz kapaklarına eşit sayıda delik açılıp, kavanozlar kapatılmıştır. Yumurtadan çıkan larvalar, bu besin ortamında 10 günlük olduklarında, 1/3'ü besin bulunan 20 ayrı kavanoza 25'şer adet birey pens yardımıyla konulmuştur. Hazırlanan yapay besin-larva ortamı 27±4 °C ve ortalama nemi %55 ± 5 olan karanlık laboratuvar koşullarına yerleştirilmiştir.

Kurulan deneme kavanozları her gün kontrol edilerek, azalan besinler kavanozların 1/3'ünü dolduracak şekilde ilave edilmiştir. Larvadan pupa evresine geçiş yapan bireylerden 20'şer tane alınıp, katlanmış pellur kâğıdı bulunan ve yapay besin ortamı bulunmayan kavanozlara konulup, 27±4 °C ve ortalama nemi %55 ± 5 olan karanlık laboratuvar koşullarına yerleştirilmiştir. Büyük balmumu güvelerinin ergin dönemi beslenme yapmadığından dolayı kavanozlara besin ilavesi edilmemiştir. Ergin dönemine geçen dişi bireyler, pellur kâğıdına yumurtlamaktadır. Pellur kâğıdı bulunan kavanozlar, her gün kontrol edilerek içerisinde yumurta bulunan pellur kâğıdı alınıp, 1/3'ü yapay besin bulunan 1 litrelik kavanozlara ilave edilmiş, pellur kağıtları bireylerin ölümü gerçekleşinceye kadar her gün yenilenmiştir. Bu sayede laboratuvar koşullarında kültür devamlılığı sağlanmıştır.

Hazırlanan besin ortamı ve cam malzemeler her kullanımdan önce 60°C sıcaklıkta 3 saat tutularak, diğer malzemeler %70'lik etil alkolde tutularak sterilize edilmiştir.

3.1.2. Fe₃O₄ Nananopartiküllerinin Karakterizasyonu

Fe₃O₄ nanopartiküllerinin (NP'lerin) morfolojisi, Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (TAUM) alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) kullanılarak incelendi. FESEM dedektöre 25 kV [71] ile bağlı, Zeiss GEMINI 500 cihazı

kullanılarak Fe₃O₄ NP'lerin görüntüleri çekildi. Fe₃O₄ NP'lerin X-ışını kırınım (XRD) paterni, Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde 98-001-7149 referans kodu ile kaydedildi. Difraktogram verileri, JCPDS standart toz kırınım kartı ve literatür çalışmaları ile karşılaştırılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fe₃O₄ Nanopartikülünün Hazırlanması ve Deneylerde Kullanılması

Demir oksit nanopartiküllerinin, *G. mellonella*'nın biyolojisine ve hemositlerine etkisi araştırılırken, Nanokar (Türkiye) firmasına ait ticari bir kullanıma hazır ürün olan ve CAS numarası: 1317-61-9, yüzey alanı 6-8 m²/g, %97 metal bazlı özellikleri taşıyan Fe₃O₄ NP kullanılmıştır. Fe₃O₄ konsantrasyonu “µg / 10 µl” olarak ifade edilmiştir. Çalışmada, Fe₃O₄ NP'nin LC₅₀ (lethal konsantrasyon 50) değerlerinin belirlenebilmesi için 1, 10, 50, 100, 200, 400 µg / 10 ul / larva dozu uygulanmıştır.

Çalışmada deney grubu kurulurken, farklı Fe₃O₄ NP solüsyonları, banyo tipi sonikatör ile 40°C'de 10 dakika süreyle homojenleştirilmiştir. Deney grupları 3 tekerrürden, her tekerrürde 6. evrede (180±20 mg) 20 larva, toplamda her deney grubunda 60 larvadan oluşmuştur. Seçilen 6. evre *G. mellonella* larvaları, deney kurulmadan önce 3 saat aç bırakılmıştır [82]. Deney grubunda altıncı evre larvalar (180 ± 20 mg), farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 50, 100, 200, 400 µg / 10 µl / larva), kontrol grubunda ise sadece 10 µl iyonize su 29 gauge mikro-ince insilün şırıngası yardımıyla, zorla besleme yöntemiyle stereomikroskop altında verilmiştir (Resim 3.1.) [26]. Kullanılan iğne her zorla besleme yapıldıktan sonra, %70'lik etil alkol, pamuk yardımıyla sterilize edilmiştir. Deney ve kontrol gruplarına zorla NP beslemesi yapılmış bireyler, besin ortamı bulunmayan sterilize edilmiş bir plastik kutuya (20 ml hacimde, gerekli hava sirkülasyonu sağlamak amacıyla, toplu iğne yardımıyla 20 delik açılarak) konulmuştur. Larva konulan plastik kutular 27±4°C ve %55 ± 5 nispi nem bulunan, karanlık laboratuvar koşullarına konulmuştur. 20 ml'lik plastik kaplara konulan deney ve kontrol grubu larvaları, 30 gün boyunca her gün kontrol edilmiş, ölü ve canlı bireyler sayılıp, probit analizleri yapılmıştır.



Resim 3.1. Zorla besleme yöntemi (force-feeding) ile 10 µl iyonize suyun *Galleria mellonella* larvasına verilmesi.

3.2.2. *G. mellonella* (Büyük Balmumu Güvesi) Larvalarında Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin Ölümcül Konsantrasyon 50 ve 90 (LC₅₀ ve LC₉₀) Değerlerinin Belirlenmesi

Lethal konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi için [71] ve [82]'nin çalışmalarının toksisite protokollerinden yararlanılmıştır. Öncelikle ppm değerleri µg / 10 µl olarak dönüştürülmüştür. LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, 7 farklı Fe₃O₄ Np konsantrasyonu (1, 10, 50, 100, 200, 400 µg / 10 ul / larva dozu ve kontrol) 6. dönem larvalar (180 ± 20 mg) üzerinde denenmiştir. Farklı miktarlarda Fe₃O₄ NP'ler iyonize suya eklenmiş, µg / 10 µl'lik bir stok solüsyonu hazırlamak için sonikatör yardımıyla disperse edilmiştir. Hazırlanan Fe₃O₄ NP'lerin farklı konsantrasyonları (1, 10, 50, 100, 200, 400 µg / 10 ul / larva), *G. mellonella* larvalarına oral yoldan zorla-besleme tekniği (force-feeding) ile verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda NP verilen *G. mellonella* larvaları 30 gün gözlemlenmiş, 30 günlük LC₅₀ ve 90 değerleri belirlenmiştir. LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, kontrol grubuna ise sadece iyonize su verilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda Fe₃O₄ NP verilen *G. mellonella* larvaları üzerindeki öldürücü konsantrasyon değerleri (LC₅₀ ve LC₉₀), 30 günde %95 güven seviyeleri ile IBM-SPSS (2011) yazılımı (IBM, NY, ABD) kullanılarak probit analizi ile tespit edilmiştir. Fe₃O₄'ün LC₅₀ değerlerine göre deney grubunun konsantrasyonları, proje kapsamındaki tüm deneysel çalışmaları için (biyojisine ve hemositlerine etkileri çalışmaları) 0,4, 2, 10, 50, 250 µg / 10 µl Fe₃O₄ NP olarak belirlenmiştir.

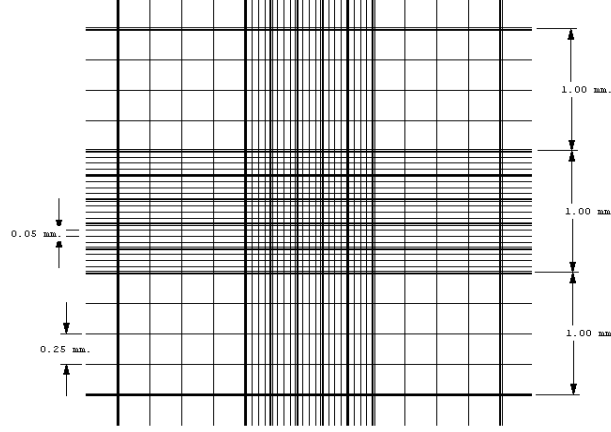
3.2.3. Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* (Büyük Balmumu Güvesi)'nin Bazı Biyolojik Parametreleri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

G. mellonella'nın 6. dönem larvaları (180 ± 20 mg) deney ve kontrol gruplarında her bir tekerrürde 20 adet olmak üzere, toplamda 3 tekerrür olacak şekilde biyolojik analizlerin gerçekleştirilmesi için belirlenmiştir. Larvalara Fe₃O₄ NP'lerinin farklı konsantrasyonları (0,4, 2, 10, 50, 250 µg / 10 µl) banyo tip sonikatörde homojenize edildikten sonra stereomikroskop altında mikro-ince insülin şırıngası (29 µl) yardımıyla, zorla besleme yöntemi ile verilmiştir. Kontrol grubuna ise sadece yine aynı mikro-inve insülin şırıngası kullanarak sadece 10 µl iyonize su verilmiştir [82]. Larvalara NP (deney grupları) ve distile su (kontrol grubu) verildikten sonra, her bir larva, 20 ml'lik steril plastik kutuların içerisine (üzerinde toplu iğne ile 20 adet delik açılmış) aktarılmıştır. Deneyde kullanılan larvalar, pupa gelişim süresini belirlemek amacıyla pupa oluncaya kadar, günlük olarak izlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Fe₃O₄ NP ve iyonize su uygulanan larvaların pupa ağırlığı üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, her bir pupa hassas terazi ile tartılmış, yine aynı kaba geri konulmuştur. Hem deney hem de kontrol grubundaki bireyler günlük olarak izlenmiş, ergin gelişim süreleri kaydedilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Fe₃O₄ NP uygulanmış deney grupları ile iyonize su uygulanmış kontrol grubunun bireylerinin ergin ağırlığı üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, ergin olan bireyler hassas terazi yardımıyla tartılmış, kaydedilmiştir.

3.2.4. Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* (Büyük Balmumu Güvesi)'nin Hemosit Sayısına Etkisi

Manyetik Fe₃O₄ NP'lerin *G. mellonella*'nın total hemosit sayılarına etkisini tespit etmek amacıyla, [71]'nin yaptığı çalışma basamakları örnek alınmıştır. *G. mellonella*'nın 6. dönem larvalarından (180 ± 20 mg) NP uygulamalarından 96 saat sonra hemolenf alınmış, hemosit sayıları tespit edilmiştir. Deney ve kontrol gruplarından 5'er adet larva kullanılmıştır. Deney üç tekerrürlü, farklı zamanlarda kurulmuştur. Deney ve kontrol gruplarında toplam hemosit sayılarını tespit etmek için, *G. mellonella* larvasının birinci arka bacakları üzerindeki segmentten 4 µl hemolenf 27 mikrokapiler tüp (Sigma) ile alındı. Alınan hemolenfte 36 µl pıhtılaşma engelleyici solüsyon (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na₂EDTA ve 0,041M sitrik asit, pH 4,5) bulunan eppendorf tüplerine alındı [84-85-86-87]. Seyreltilmiş hücre karışımı (1: 10 oranında) mikropipet ile çek-bırak yöntemiyle karıştırıldı. Karıştırılan hücre karışımı, 10 µl mikropipetle çekilip, 0,100 mm derinliğine sahip Neubauer hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer; Superior, Germany) yüklendi (Resim 3.2.). Sayım için

hemositometre lamının orta kısmında bulunan, 25 orta büyüklükte kareye ayrılmış ve her bir orta karenin de 16 küçük kareye bölündüğü 1 mm²'lik büyük karenin tamamı sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi (Resim 3.2.).

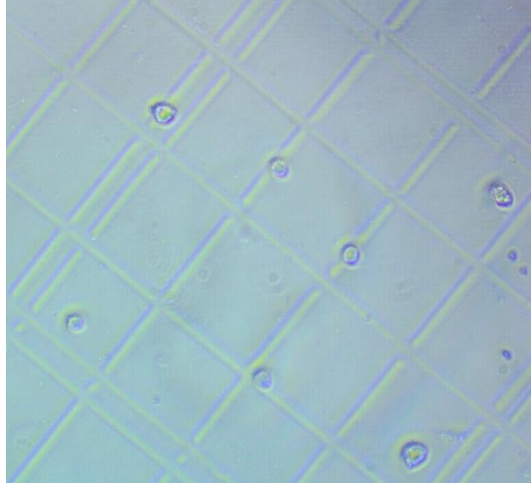


Resim 3.2. Neubauer hemositometresi sayım alanı.

Mililitredeki toplam hemosit sayılarının hesaplanması için;

Hücre sayısı / ml = Büyük karede saydığımız hücre sayısı x Sulandırma katsayısı (10) x 10⁴ formülünden yararlanıldı [71].

Neubauer hemositometresine yüklenen hücre karışımı, SWIFT SW380T marka mikroskop ile sayılıp, SWİFT marka mikroskop kamerası ile görüntüsü elde edilmiştir (Resim 3.3.).



Resim 3.3. Neubauer hemositometreye yüklenen hemositler.

3.2.5. Mikronükleus Durumu ve Nekrotik-Apoptotik-Mitotik İndeksler

G. mellonella hemositlerinde apoptotik, nekrotik ve mitotik indeksleri ve mikronükleus içeren yüzdeleri hesaplamak amacıyla, [88] ve [71]'nin oluşturdukları boyama sıralaması, metot ve prosedür uygulanmıştır. Boyamalar oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Larvalar ve slaytlar

%70'lik etanol emdirilen steril bezle temizlendi ve kuruması beklendi. Larvaların, arka bacaklarının birinci segmenti böcek iğnesi yardımıyla delinerek, mikropipet ile 5 µl hemolenf alınıp, temizlenen ve kurutulan lam üzerine yayılıp, 30 dk kurumaya bırakıldı. Hemolenf bulunan lam üzerine, hemositlerin lama yapışması amacıyla %70'lik etil alkol damlatılıp, 5 dk kuruması beklendi. Kuruyan lam üzerine, hücre nükleusunu boyamak amacıyla hematoksilen boyası damlatılıp, 1 dk beklendi. Hematoksilenle boyanan lam, fazla miktarda hematoksileni ortamdan uzaklaştırmak amacıyla akan musluk 1 dk tutuldu. Fazla hematoksilenden arınan lam üzerine, hemen hemositlerin sitoplazmalarının boyanması amacıyla eosin boyası damlatıldı. Eosinle boyanan lamlar 45 sn bekletilip, akan musluk suyu altında 1 dk tutuldu. Boyanan lamlar oda sıcaklığında 30 dk kurutuldu. Son olarak boyanmış hemositleri içeren lam üzerine entellan damlatılıp, lamel ile kapatıldı.

Hazırlanan deney ve kontrol gruplarına ait her preparattan, rastgele 1000 adet hemosit seçildi. Hazırlanan her preparat, SWIFT SW380T marka mikroskop ile 1000X büyütmede sayılıp, SWIFT marka mikroskop kamerası ile görüntüleri elde edilmiştir. Her deney ve kontrol grubu 5 larva, 3 tekerrürlü olarak incelendi. Hazırlanan preparatlarda canlı, apoptotik, nekrotik, mitotik ve mikronükleus sayıldı. Hazırlanan preparatlarda canlı, apoptotik, nekrotik, mitotik ve mikronükleus içeren hemositler aşağıdaki kriterlere göre belirlendi.

***Canlı hücre:** Sitoplazma nükleusunda herhangi bir anomali saptanmayan (yoğun sitoplazmik vakuoller, nükleus fragmentleri, mikronükleus oluşumu içermeyen) hücreler olarak değerlendirildi.

***Mikronükleus;** Hücrenin nükleusu ile aynı renk ve aynı yoğunlukta boyanan, hücre nükleusunun maximum 1/3'ü kadar büyüklükte olan nükleus fragmentleridir [89].

***Nekrotik hemositler;** Nükleusta ve sitoplazmada büyük vakuoller bulunduran ve sitoplazması mat görünümde olan hücreler olarak değerlendirildi [90].

***Apoptotik hemositler;** Sitoplazması canlı hücrelere göre daha koyu, ilk safhalarda kromatin yoğunlaşması gösteren ve son safhalarında ise nükleer fragmentler gösteren hücreler olarak değerlendirildi [90].

***Mitotik hemositler;** Mitoz bölünmenin gerçekleştiği hücreler olarak değerlendirildi. Mitoz bölünmenin farklı evrelerinde olan hücrelerin sayımı [91] ve [92]'ye göre yapıldı.

3.2.6. İstatiksel Analiz

Fe_3O_4 NP'nin LC_{50} değerlerini tespit etmek amacıyla probit analizi yapıldı. Probit analizi için SPSS (versiyon 20.0, SPSS Science, Chicago, IL) kullanıldı. LC_{50} değeri tespit edildikten sonra deney ve kontrol gruplarına ait ortalamalar, SPSS (versiyon 20.0, SPSS Science, Chicago, IL) programı kullanılarak karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda elde edilen verilerin normal dağılım gösterilip-gösterilmediğine bakıldı. Elde edilen veriler normal dağılım gösterdiyse, grup ortalamaları "Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı. Ortalamalar arasındaki farklar varyansı homojen olduğunda Tukey HSD, homojen değilse Tamhane T2 post hoc testleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen verilerden normal dağılım tespit edilmediğinde, gruplar arasında fark olup olmadığı parametrik olmayan Kruskal Wallis testi ile belirlendikten sonra gruplar arasındaki farklar Mann Whitney U testleri ile belirlendi. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda $P < 0,05$ anlamlı olarak alınmıştır. Yapılan çalışmalarda bulunan tüm istatistiksel sonuç tablolarında, kontrol grubu "0" olarak belirtilmiştir.

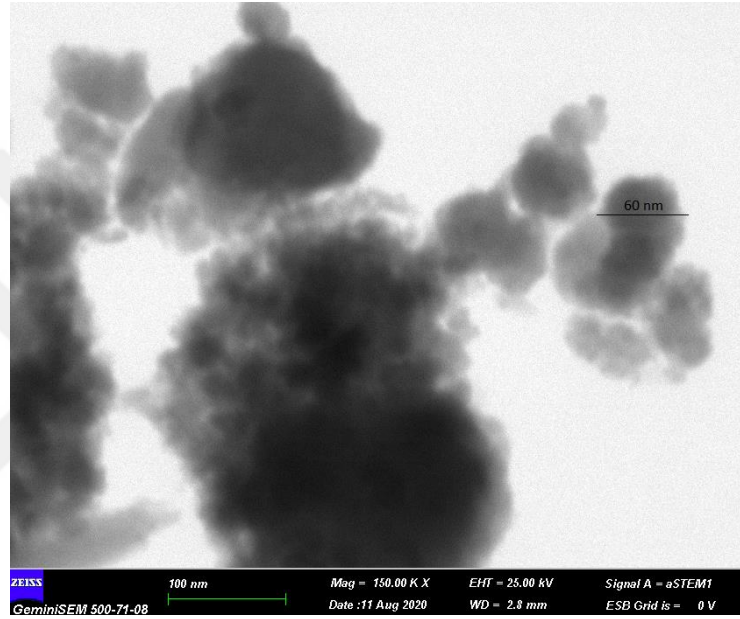
Farklı konsantrasyonlarda Fe_3O_4 NP uygulaması yapılan deney grubu ve kontrol gruplarında *G. mellonella*'nın hemositlerinde, canlı hücre sayısı indeksine, mitotik, apoptotik ve nekrotik indekslere etkisini belirleyen varyans analizlerinde yüzde olarak verilen tüm değerler, analizlerden önce arcsinüs karekökleri alınarak normalleştirildikten sonra SPSS istatistik programı (SPSS, versiyon 20.0, SPSS Science, Chicago, IL) ile istatistiksel analizleri yapıldı. Tüm istatistik testlerinde güven sınırı 0,05 olarak esas alındı [83].

4. BÖLÜM

BULGULAR

4.1. Fe₃O₄ Nanopartikülünün Karakterizasyonu

Aşağıda Şekil 4.1.'de, toz formundan elde edilen Fe₃O₄ (demir oksit) NP'lerin FESEM görüntüsü verilmiştir. FESEM görüntüleme sonuçlarına göre tez çalışmasında kullanılmış olan NP'lerin genel olarak küresel bir morfolojiye sahip olduğu anlaşılmıştır.



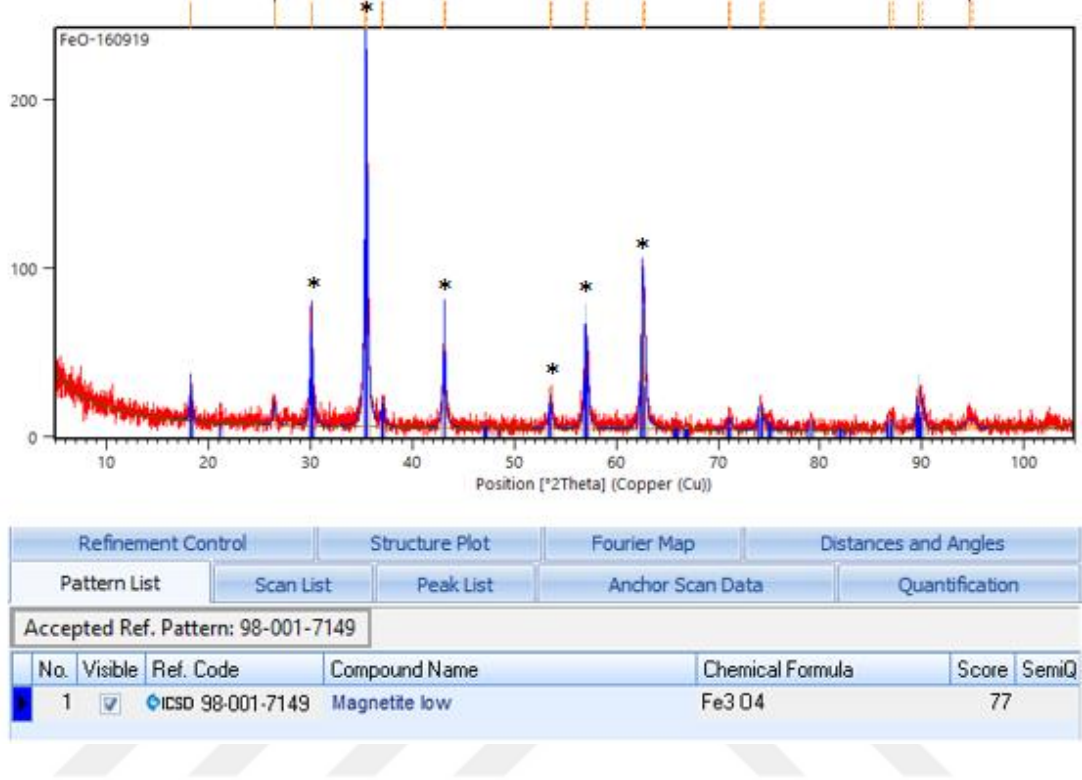
Resim.4.1. Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin FESEM görüntüsü (150.000x). Ölçü çubuğu 100 nm'yi belirtmektedir. Nanopartikül çapını gösteren sağ üstteki ölçü çubuğu 60 nm'lik uzunluğu göstermektedir.

Fe₃O₄ NP'lerin XRD pik listesi ve XRD difraktogramı (kırınım grafiği) aşağıda Tablo 4.1 ve Resim 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Fe₃O₄ nanopartiküllerinin XRD pik listesi

Pos. [°2Th.]	Height [cts]	FWHM Left [°2Th.]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]	Tip Width	Ref. Code
18.27(1)	14(2)	0.23(6)	4.85134	8.42	0.2763	98-001-7149
30.091(7)	41(3)	0.30(3)	2.96744	24.86	0.3582	98-001-7149
35.453(3)	163(6)	0.27(2)	2.52994	100	0.3265	98-001-7149
37.08(2)	10(1)	0.28(5)	2.42286	5.92	0.3368	98-001-7149
43.109(7)	36(3)	0.30(4)	2.09671	22.31	0.3576	98-001-7149
53.50(2)	13(2)	0.36(9)	1.71152	8.09	0.4313	98-001-7149
57.022(7)	43(3)	0.38(4)	1.61376	26.27	0.4573	98-001-7149
62.625(6)	74(4)	0.35(3)	1.48218	45.16	0.4249	98-001-7149
71.05(4)	4(1)	0.6(1)	1.32576	2.47	0.7187	98-001-7149
74.17(2)	11(2)	0.5(1)	1.27749	6.77	0.5440	98-001-7149
86.88(4)	4(1)	0.6(1)	1.12025	2.74	0.7405	98-001-7149
89.75(1)	17(1)	0.57(6)	1.09172	10.67	0.6853	98-001-7149

Tablo 4.1.'de yer alan Pos. [$^{\circ}2\theta$], FWHM Left [$^{\circ}2\theta$] ve X-Ray dalga uzunluğu (0.15 Å) değerlerine *instanano.com*' a ait otomatik hesaplama modülü kullanılarak Scherrer eşitliği uygulandığında Fe₃O₄ nanopartiküllerinin kristal boyutu 18.54 nm olarak ölçülmüştür.



Resim 4.2. Fe₃O₄ nanopartiküllerinin XRD difraktogramı.

Fe₃O₄ NP'lerinin XRD pik listesi verileri (Tablo 4.1) ve XRD difraktogramı verileri (Resim 4.2) standart PDF kart referans kodu (ICSD Numarası 98-001-7149) ile birlikte Manna ve arkadaşlarının 2021 [93] yılında gerçekleştirmiş olduğu bir çalışma ile eşleşme göstermiştir. Elde edilen piklerden 30.09*, 35.45*, 43.10*, 53.50*, 57.02* ve 62.62* değerlerinin 2θ düzleminde (220), (311), (400), (422), (511) ve (440) kristal düzlemine karşılık geldiği (Resim 4.2) ve Fe₃O₄ NP ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

4.2. Fe₃O₄ Nanopartikülünün Ölümcül Konsantrasyon 50 ve 90 (LC₅₀ ve LC₉₀) Değerlerinin Belirlenmesi

Fe₃O₄ NP'lerini 30 gün sonunda gerçekleşen LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri *G. mellonella* larvalarında sırasıyla 482,72 µg/10 µl ve 1843,89 µg/10 µl (Probit, Ki Kare= 30,383, df = 5, P = 0.00, y=0,65+1.09E-5*x) olarak belirlenmiştir. Bu nedenle subletal konsantrasyonlar olan; 0,4, 2, 10, 50, 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonları, bu tez çalışmasında deney grupları

konsantrasyonları olarak belirlenmiştir.

4.3. Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* Bazı Biyolojik Parametreleri Üzerindeki Etkileri

Manyetik Fe₃O₄ NP'lerini *G. mellonella*'nın bazı yaşam parametreleri üzerindeki etkilerine ait sonuçlar (pup gelişim süresi, pup ağırlığı, ergin gelişim süresi, ergin ağırlığı ve ergin ömrüne ait sonuçlar) aşağıda Tablo 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.2. Demir oksit nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*'nın bazı yaşam parametreleri üzerine etkileri

Fe ₃ O ₄ Nanopartikül konsantrasyonları (µg/10 µl)	Pup gelişim süresi (Gün) (Ortalama ^b ± SH) ^c	Pup ağırlığı (mg) (Ortalama ^b ± SH) ^c	Ergin gelişim süresi (Gün) (Ortalama ^b ± SH) ^c	Ergin ağırlığı (mg) (Ortalama ^b ± SH) ^c	Ergin ömür uzunluğu (Gün) (Ortalama ^b ± SH) ^c
0 ^a	10,08 ± 0,63 ^{ab}	110,61 ± 2,69 ^a	14,08 ± 0,43 ^a	65,29 ± 1,99 ^a	7,61 ± 0,59 ^a
0,4	10,42 ± 0,74 ^{ab}	118,39 ± 2,69 ^{ab}	15,65 ± 0,47 ^{ab}	68,47 ± 2,04 ^a	7,73 ± 1,00 ^a
2	9,04 ± 0,39 ^a	112,40 ± 1,75 ^{ab}	15,43 ± 0,22 ^{ab}	69,00 ± 1,85 ^a	7,97 ± 0,65 ^a
10	10,48 ± 0,44 ^{ab}	112,00 ± 2,23 ^{ab}	16,69 ± 0,37 ^b	63,97 ± 1,82 ^a	8,13 ± 0,45 ^a
50	9,76 ± 0,44 ^a	116,12 ± 2,20 ^{ab}	14,97 ± 0,57 ^{ab}	65,76 ± 2,03 ^a	6,25 ± 0,31 ^a
250	11,65 ± 0,63 ^b	121,73 ± 3,64 ^b	15,47 ± 0,39 ^{ab}	69,82 ± 3,5 ^a	7,00 ± 0,81 ^a
Uygulanan SPSS testi:	Kruskal Wallis Test, P=0,00 < 0,05	Kruskal Wallis Test, P=0,008 < 0,05	Kruskal Wallis Test, P=0,000 < 0,05	Kruskal Wallis Test, P=0,340 > 0,05	Kruskal Wallis Test, P=0,178 > 0,05

a "0" Kontrol grubu.

b Değerler, her birisi 20 larvadan oluşan üç tekerrürün ortalamasıdır. Ergin evreye ulaşamayan larvalar hesaplama dahil edilmemiştir.

c Aynı sütunda farklı harflere sahip gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Pupa gelişim süresinin ortalaması, NP'ye maruz kalan larvalar ile karşılaştırıldığında 250 µg/10 µl konsantrasyona maruz kalan larvalarda (11,65 gün) istatistiksel açıdan önemli düzeyde artış gözlemlenmiştir ($\chi^2= 30,294$, $df= 5$, $P= 0,00$) (Tablo 4.2.). Ancak pupa gelişim süresi ortalamaları açısından deney grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 4.2.). Fe₃O₄ NP'ye maruz kalan larvalardan oluşan pupaların ortalama ağırlığı 110,61 mg (kontrol grubu)- 121,73 mg (250 µg/10 µl Fe₃O₄) NP konsantrasyonu arasında değişkenlik göstermiştir (Tablo 4.2.). Artan Fe₃O₄ NP konsantrasyonunun etkisiyle pupa ağırlığı ortalaması 121,73 mg ortalama değer ile 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($\chi^2= 15,585$, $df= 5$, $P= 0,008$) (Tablo 4.2.). 10 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonuna maruz kalan bireylerin ortalama ergin gelişim süresinin 16,69 gün

ile kontrol grubu ile (ortalama 14,08 gün) karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir ($\chi^2= 22,339$, $df= 5$, $P= 0,00$) (Tablo 4.2). Ortalama ergin ağırlığının (mg) kontrol ve deney grupları arasında önemli ölçüde farklılık göstermediği anlaşılmıştır ($\chi^2= 5,668$, $df= 5$, $P= 0,340$) ve de ergin ağırlığı ortalamalarının 63,97 ile 69,82 mg arasında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.2). Benzer şekilde, tüm Fe₃O₄ NP konsantrasyonlarında ortalama ergin yaşam süresi ortalamalarının deney ve kontrol grupları arasında önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($\chi^2= 7,631$, $df= 5$, $P= 0,178$). Söz konusu değerlerin ortalamaları 6,25 (50 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonu) ile 8,13 gün (10 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonu) arasında değişkenlik gösterdiği Tablo 4.2’de görülmektedir.

4.4. Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* ’nın Hemosit Sayısına Etkisi

Zorla besleme tekniği ile farklı konsantrasyonlarda manyetik Fe₃O₄ NP’ye maruz kalan son dönem *G. mellonella* larvaların hemosit sayılarına ait veriler aşağıda Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.3. Demir oksit Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*’nın hemosit sayısına etkisi (zorla besleme uygulamasından 96 saat sonra)

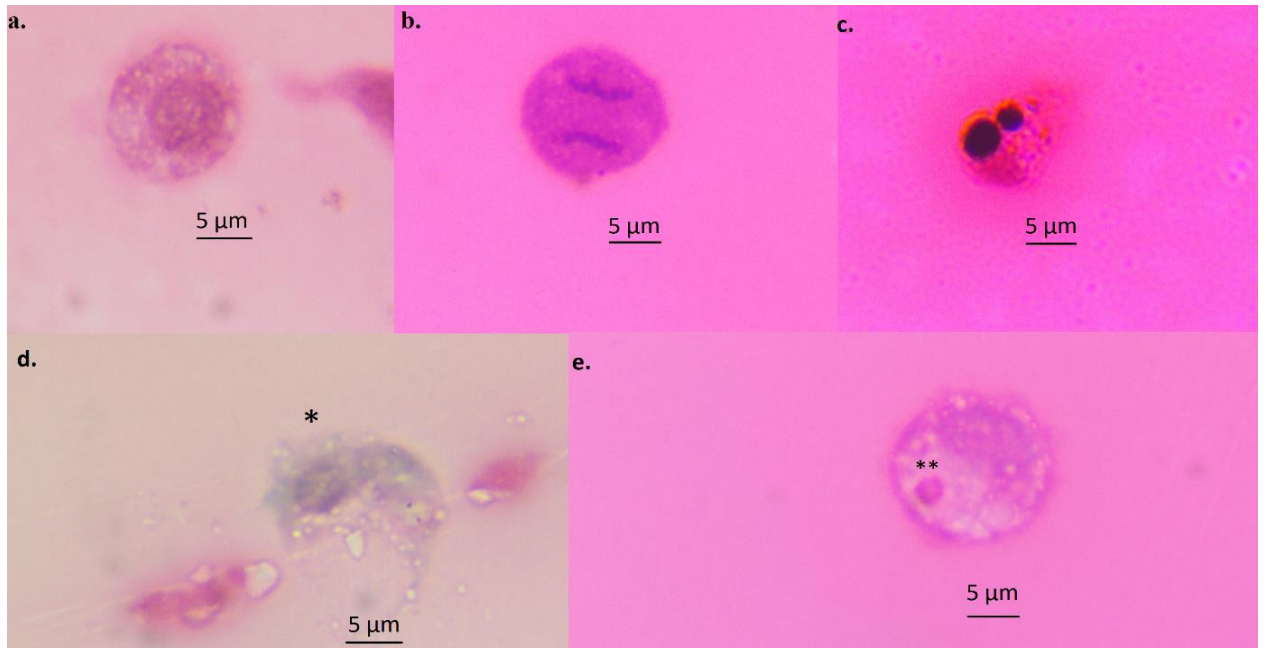
Fe ₃ O ₄ konsantrasyonları (µg/10 µl)	Nanopartikül konsantrasyonları (µg/10 µl)	Hemosit sayısı / ml (Ort ± SH) ^a
0		34,64 ± 1,88 ^a
0,4		33,66 ± 2,88 ^{ab}
2		34,85 ± 2,08 ^a
10		24,66 ± 1,79 ^{bc}
50		26,46 ± 1,56 ^{bc}
250		22,66 ± 2,49 ^c

^aKruskal Wallis, Man Whitney U Test $P<0,05$.

Yukarıda Tablo 4.3’ten de anlaşılacağı gibi demir oksit NP uygulamasında kontrol grubu ile 10, 50 ve 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvaların hemosit sayıları ortalamaları arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark bulunmaktadır ($\chi^2=27,848$, $df= 5$, $P= 0,00$). Söz konusu deney grubuna ait nanopartikül konsantrasyonuna maruz kalan larvaların hemosit sayısı ortalamaları kontrol grubuna göre önemli düzeyde bir azalma göstermiştir (Tablo 4.3).

4.5. Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*'nın Hemositlerinde Mikronükleus Oluşumuna, Nekrotik, Apoptotik ve Mitotik İndekslere Etkisinin Belirlenmesi

Canlı, mitotik, nekrotik ve mikronükleus içeren hemosit hücrelerinin fotoğrafları aşağıda Resim 4. 3'te verilmiştir. Manyetik Fe₃O₄ NP'lerinin *G. mellonella*'nın hemositlerinde mikronükleus oluşumuna, nekrotik, apoptotik ve mitotik indekslere etkisi ise (zorla besleme uygulamasından 96 saat sonra) aşağıda Tablo 4.4'te verilmiştir.



Resim 4.3. Canlı, mitotik, nekrotik ve mikronükleus içeren hemosit hücrelerinin ışık mikroskopu görüntüleri: a. Canlı hemosit hücresi, b. mitotik hemosit hücresi, c. apoptotik hemosit hücresi, d. nekrotik hemosit hücresi, e. mikronükleus bulunduran hemosit hücresi'dir. "*" nekroz olmuş hemosit hücresini, "***" ise mikronükleusu göstermektedir. Ölçü çubuğu 5 µm'luk uzunluğu göstermektedir.

Tablo 4.4. Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*'nın hemositlerinde mikronükleus oluşumuna, nekrotik, apoptotik ve mitotik indekslere etkisi (zorla besleme uygulamasından 96 saat sonra)

Fe ₃ O ₄ Nanopartikül konsantrasyonları (µg/10 µl)	Canlı hücre (%) ^{*si}	Mitotik hücre (%) ^{'si}	Apoptotik hücre (%) ^{*si}	Nekrotik hücre (%) ^{*si}	Mikronükleus içeren hücre (%) ^{*si}
0	94,18 ^{ab}	3,25 ^a	0,66 ^a	0,72 ^{ab}	1,14 ^{ab}
0,4	95,13 ^a	2,36 ^a	0,70 ^{ab}	0,75 ^{ab}	1,04 ^a
2	94,81 ^a	2,22 ^a	1,00 ^{ab}	1,10 ^{ab}	0,86 ^a
10	93,48 ^{bc}	2,41 ^a	1,72 ^b	0,50 ^a	1,90 ^{bc}
50	91,66 ^c	2,31 ^a	1,76 ^b	1,49 ^{bc}	2,77 ^c
250	92,44 ^{bc}	2,14 ^a	1,82 ^b	2,12 ^c	1,47 ^{ab}

*Tukey Testi P<0,05.

Demir oksit NP ile yapılan uygulamadaki sonuçlarda; canlı hücre yüzdesi açısından 50 µg/10 µl Fe₃O₄ nanopartikül konsantrasyonlarına maruz kalan larvalar (%91,66) ile kontrol grubu (%94,18) arasındaki fark önemli bulunmuştur ($\chi^2=8,324$, df= 5, P= 0,00) (Tablo 4.4). Mitotik indeks ortalamaları tüm deney gruplarında, kontrol grubuna göre azalma gösterirken, gerçekleşen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı anlaşılmıştır ($\chi^2=1,502$, df= 5, P= 0,198) (Tablo 4.4). En yüksek mitotik indeks 50 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonunda (%2,41) olarak gözlemlendi. Apoptotik hücrelerin % durumları; kontrol grubu ile diğer demir oksit NP konsantrasyonlarına göre kıyaslandığında 10, 50 ve 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvaların apoptotik hücre %'leri arasında ki fark kontrol grubuna göre artış göstermek suretiyle önemli bulunmuştur ($\chi^2=6,572$, df= 5, P= 0,00) (Tablo 4.4). Nekrotik hücreler açısından kontrol grubu ile 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonuna maruz kalan larvalar arasındaki fark anlamlıdır ($\chi^2=6,941$, df= 5, P= 0,00) (Tablo 4.4). Son olarak, mikronükleus içeren hemositlerin %'leri ise kontrol grubunda %1,14 olarak gerçekleşti. En yüksek mikronükleus %'si 50 µg/10 µl Fe₃O₄ konsantrasyonunda (%2,77) bulunmuştur. Bu konsantrasyonda mikronükleus içeren hemositlerin yüzdesinde kontrol grubuna göre gerçekleşen 2,42 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\chi^2=11,709$, df= 5, P= 0,00) (Tablo 4.4).

5. BÖLÜM

TARTIŞMA

5.1. Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* Bazı Biyolojik Parametreleri Üzerindeki Etkileri

Günümüzde, manyetik demir oksit NP'lerinin *G. mellonella* üzerindeki toksik etkileri üzerine çalışmalar oldukça azdır. Manyetik demir oksit NP'lerinin toksik etkilerinin, model bir deney organizması olan *G. mellonella* üzerinde araştırılması çevresel izleme çalışmaları için yararlı bir referans sağlayabilir. Ayrıca, bilindiği üzere böcekler; ağır metallerin ekosistemdeki biyobirikimi ve biyotransferi ile ilgili çalışmalarda biyoindikatör olarak da kullanılmaktadırlar [94]. Bu anlamda, gerçekleştirilen bu yüksek lisans tez çalışmasında, en yüksek demir oksit NP konsantrasyonunda, daha düşük demir oksit NP konsantrasyonuna kıyasla pupa gelişim süresinin ortalamasının uzadığı gözlenmiştir (Tablo 4.2). NP'lerin, böceklerin biyolojik parametrelerinde gecikmelere neden olmasının nedeni [95] ve [96]'ya göre şu şekilde açıklanmıştır: "NP'ler, bağırsağa girdikten sonra, peritrofik membranı geçerek apoptozu indükleyebildiler". Bu çalışmada da *G. mellonella*'nın hemolenfinde bulunan hemositlerde apoptotik hücre %'si kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10, 50 ve 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvalarda artış göstermiştir (Tablo 4.4.). Dolayısıyla, demir oksit NP'lerin böceğin bağırsağında neden olduğu bu toksik etki böceğin biyolojisinde gecikmelere neden olmuş olabilir. Nitekim, metal oksit nanopartikülleri ile yapılmış ve metal oksit NP'lerinin böceklerin hücre hücresel sistemlerinde apoptoza neden olduğunu gösteren bazı çalışmalar da mevcuttur [71, 95-96]. Artan NP konsantrasyonuna yanıt olarak ortaya çıkan apoptotik mekanizmalar nedeniyle larvada gerçekleşen NP stresinin bir sonucu olarak pupa gelişim süresi uzamıştır (Tablo 4.2.).

Gümüş NP'lerine maruziyetten kaynaklanan fizyolojik stres sonucunda pupa ağırlıklarındaki değişiklikler, iki lepidopter zararlısında (Asya tırtılı, *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera: Noctuidae) ve kastor yarı ilmek güvesi olan *Achaea janata* L. (Lepidoptera: Noctuidae)) üzerinde [97] tarafından çalışılmıştır. Araştırmacılar, her iki test böceğinde de gümüş NP ve gümüş nitrat konsantrasyonlarındaki azalma ile birlikte larva ve pupa vücut ağırlıklarının azaldığını göstermişlerdir. Ancak gerçekleştirilen bu çalışmada, ortalama pupa ağırlığı en yüksek demir oksit NP konsantrasyonunda (250 µg/10 µl) kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış göstermiştir.

G. mellonella'nın pupa ağırlıklarında gerçekleşen bu artışın nedeni, [25] tarafından açıklandığı gibi demir oksit nanopartiküllerine maruziyetten sonra böcekte juvenil hormon bağlayıcı

proteinlerin (JHBP'ler) ekspresyonunun yukarı regülasyonu ile ilişkili olabilir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 µg/10 µl demir oksit NP konsantrasyonunda, ergin gelişim süresi önemli ölçüde uzamıştır (Tablo 4.2). Bilindiği üzere böceklerde Juvenil hormon: korpus allatum' dan salgılanır, böcek metamorfozunu inhibe eder ve böcek yaşamı boyunca böceğin; gelişme, üreme, diyapoz, polifenizm ve böcek davranışlarını düzenler [98]. Juvenil hormon metabolizmasının larva gelişim süresini etkileyerek *G. mellonella*'da ergin gelişim süresinin uzamasına neden olabileceği bildirilmiştir [99]. Sonuç olarak, çalışmada ergin gelişim süresinin artmasının nedeninin demir oksit NP'lerinin böcekteki juvenil hormon gibi metamorfozla ilişkili hormonların düzeyinde meydana gelen düzensizlikten kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Tablo 4.2.).

Bag ve arkadaşları 2020 [100], Fe₃O₄-GG nanokompozitinin (GGNC'ler) *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) üzerindeki çeşitli davranışsal, gelişimsel, sitotoksik ve genotoksik etkilerini kontrol etmeyi amaçladıkları bir çalışmada, biyomoleküler etkileşimi araştırmak için GGNC'leri ayrıca Floresein izotiyosiyanat ile etiketlemişlerdir. Böcek besini ile çeşitli konsantrasyonlarda nanokompozitler karıştırılmış ve sineklerin yaşam döngüsünü tamamlamasına izin vermişlerdir. Yumurtadan çıktıktan sonra 1. dönem larvalar GGNC'lerle karıştırılmış yiyecekleri yemeye başlamışlardır. Daha sonra, 3. dönem larvalar, bağırsak içindeki çeşitli davranışsal ve morfolojik anormallikler için araştırılmıştır. 3. dönem larvaların, bağırsakta kusurlu tarama hızına, tarama yoluna ve daha fazla sayıda mikronükleusa sahip olduğu anlaşılmıştır. Benzer şekilde, ergin sineklerde termal duyarlılık, tırmanma davranışının değiştiği de bulunmuştur. Ergin sineklerde, protein, karbonhidrat, trigliserit ve antioksidan enzimlerin varyasyonu ile daha da ilişkili olan vücut ağırlığında önemli düzeyde bir azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, GGNC'leri çeşitli biyolojik uygulamalar için genotoksik olmayan bir nanoparçacık olarak önermişlerdir.

Farklı NP'lerin böcekler üzerinde etkilerinin çalışıldığı bazı çalışmalarda: Naz ve ark. 2017 [101], gümüş NP'lerin *Aedes aegypti*'ye (Diptera: Culicade) karşı önemli düzeyde larvisit aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Meng ve ark. (2017) [25], gümüş NP'lerinin ipek böceği *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) türü üzerinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada, gümüş NP'lerinin düşük konsantrasyonlarının (<400 mg/L) *B. mori*'nin büyümesini ve koza ağırlıklarını desteklediğini göstermiştir.

Silisyum dioksit (SiO₂) NP'lerinin (20- 55 nm) *D. melanogaster*'in 3. evre larvaları üzerine olası toksik etkilerinin gerçekleştirildiği bir çalışmada, meyve sineği larvalarına 0,1, 1, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda SiO₂ NP'leri uygulanmış ve farklı saat aralıklarında kontrollü deneyler

yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, larvalara uygulanan SiO₂ NP'lerinin mortaliteyi tüm konsantrasyonlarda kontrole göre arttırdığı, pupa ve ergin birey oluşumunu ise azalttığı belirlenmiştir [102].

5.2. Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* 'nın Hemosit Sayısına Etkisi

10, 50 ve 250 µg/10 µl demir oksit NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvaların hemosit sayıları ortalamaları ile kontrol grubu larvalarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark ortaya çıkmıştır (Tablo 4.3). Park ve ark. 2014 [103] yılında gerçekleştirmiş oldukları bir çalışmada, bir murin peritoneal makrofaj hücre hattı olan RAW264.7 hücrelerini kullanılarak manyetik demir oksit nanoparçacıklarının (M-FeNP'ler) hücreye alım sürecini ve toksik mekanizmasını araştırmışlardır. Çalışmada, M-FeNP'lerin, hücrelerin hareketliliğini belirgin şekilde arttırdığı belirtilmiştir. NP'lere maruziyetten 24 saat sonra, M-FeNP'lerin serbestçe sitozolde veya endoplazmik retikulum (ER) gibi otolizozom içeren organellere yerleşmiştir. Çalışmada, hücre canlılığının, S fazındaki tutuklama ile bağlantılı olarak doza bağımlı bir şekilde azalmıştır. ATP üretimi de mitokondriyal hasarla birlikte hızla azalmış, ROS (reaktif oksijen türleri) üreten hücre sayısı ise artış göstermiştir. Bilindiği üzere, apoptozu tetikleyen mekanizmalardan birisi ROS türleridir ve mitokondri membran potansiyelinde azalmaya neden olmaktadır. Park ve ark. 2014'ün [103] çalışmasında, oksidatif stres ve ER stresi ile ilgili genlerin seviyeleri yukarı regüle edilirken, transkripsiyonla ilgili genlerin seviyeleri aşağı regüle edilmiştir. Ek olarak, otofaji ve ER stresi ile ilgili proteinlerin seviyeleri artmış ve zamanla apoptotik hücre sayısı da artış göstermiştir. Çalışmada, toplam hemosit sayısında görülen benzer toksik etkiler (Tablo 4.3.) apoptotik hücre yüzdesindeki istatistiksel olarak önemli düzeydeki artışlarla Tablo 4.4.'te görülebilmektedir. Söz konusu tablo incelendiğinde, apoptotik hücrelerin % durumları; kontrol grubu ile diğer demir oksit NP konsantrasyonlarına göre kıyaslandığında 10, 50 ve 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvaların apoptotik hücre %'leri arasında ki fark kontrol grubuna göre artış göstermek suretiyle önemli bulunmuştur. Sonuç olarak, Tablo 4.3'te görülen, 10, 50 ve 250 µg/10 µl demir oksit NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvaların hemosit sayıları ortalamalarındaki önemli düzeyde azalmanın nedeni aynı konsantrasyonlarda Tablo 4.4.'te elde edilen apoptotik hücre sayısındaki artış olabilir. Park. ve ark. 2014'te [103] detaylı olarak anlatılan oksidatif stres, ER stresi ve bunun sonucunda ortaya çıkan apoptotik hücre sayısındaki artış, bu çalışmada hemositlerde de gerçekleşmiş olabilir. Çünkü Tablo 4.4.'teki apoptotik hücre

sayısındaki artış bu görüşümüzü desteklemektedir. Yine Tablo 4.4. incelendiğinde, aynı demir oksit NP'leri konsantrasyonlarına larvalar maruz kaldığında, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdelerindeki artış nedeniyle canlı hücre %sinin artan konsantrasyona bağlı olarak önemli düzeyde azalma gösterdiği de anlaşılmaktadır.

Bakır fosfat nanoçiçekleri (p-CPnfs) ve bunların *G. mellonella*'nın hemositleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, nanoçiçeklere maruziyetten 24 saat süre sonrasında, 1000, 2000 ve 6000 ppm p-CPnfs konsantrasyonlarının, *G. mellonella* larvalarının toplam hemosit sayısını (THC'ler) önemli ölçüde artırdığını tespit etmişlerdir [104]. Araştırmacılar hemosit sayısındaki bu artışın nedeninin; toksik maddenin detoksifikasyonuna karşı böceğin bir savunma aksiyonu aldığını [105], hematopoezdeki artıştan kaynaklı olabileceğini [106], son olarak dolaşımdaki granülositlerin, mitotik hücre sayısındaki artışın ya da otonom hücre bölünmesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir [71, 107]. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada her ne kadar artan konsantrasyona bağlı olarak mitotik hücre %si kontrol grubuna göre azalma gösterse de söz konusu bu azalma istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmamıştır (Tablo 4.4.).

Bakır oksit NP'lerinin *G. mellonella* larvalarının toplam hemosit sayısına etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, bakır oksit NP'lerinin, böceğin immun sistemi üzerinde toksik etkilere neden olarak, toplam hemosit sayısı üzerinde bir azalmaya neden olduğunu bildirmişleridir [94]. Araştırmacı, toplam hemosit sayısındaki azalmanın nedenini "ağır metal ya da insektisit gibi toksik maddelere maruziyet sonucunda, ilgili toksik maddenin hematopietik organlardan hemositlerin salınımının baskılanmasının ve bunun sonucunda söz konusu bu organların fonksiyonlarının inhibisyonu sonucunda da sitotoksik etkilerin meydana gelmesi" şeklinde açıklamıştır. Ayrıca aynı araştırmacı, böcek vücuduna giren metal oksit nanopartikülünün enkapsülasyon ve nodül oluşumuna neden olabileceğini ve hemositlerin kümeleşmesine yol açarak total hemosit sayısında azalma meydana geldiğini bildirmiştir [94]. Bu çalışmada, Tablo 4.3'te görülen, 10, 50 ve 250 µg/10 µl demir oksit NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvaların hemosit sayıları ortalamalarındaki önemli düzeyde azalmanın nedeni Tunçsoy (2020)'un [94] açıklamış olduğu bu fizyolojik nedenlerden kaynaklı olabilir.

5.3. Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*'nın Hemositlerinde Mikronükleus Oluşumuna, Nekrotik, Apoptotik ve Mitotik İndekslere Etkisi

Apoptoz, genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olay iken nekroz ise rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreçtir. En yaygın nedeni ise hipoksidir. Arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddelerin ve ağır metallerin nekroza neden olduğu bilinmektedir. Nekroz sırasında mitokondriyal ROS üretimi artar, nonapoptotik proteazlar aktive olur, ATP üretimi azalır ve Ca⁺⁺ kanalları açılır [108-110]. Mikronükleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. Mikronükleus testi fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan bir testtir [111].

Çalışmada, demir oksit NP ile yapılan uygulamadan 96 saat sonraki sonuçlarda; canlı hücre yüzdesindeki azalma, 10, 50 ve 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvalar ile kontrol grubu arasında önemli bulunmuştur (Tablo 4.4.). Apoptotik hücrelerin % durumları; kontrol grubu ile diğer demir oksit NP konsantrasyonlarına göre kıyaslandığında 10, 50 ve 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvaların apoptotik hücre %'leri arasında ki fark kontrol grubuna göre artış göstermek suretiyle önemli bulunmuştur (Tablo 4.4). Nekrotik hücreler açısından kontrol grubu ile 50 ve 250 µg/10 µl Fe₃O₄ NP konsantrasyonuna maruz kalan larvalar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.4.). Son olarak, en yüksek mikronükleus %'si 50 µg/10 µl Fe₃O₄ konsantrasyonunda bulunmuştur ve bu konsantrasyonda mikronükleus içeren hemositlerin yüzdesinde kontrol grubuna göre gerçekleşen 2,42 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.4).

Bu çalışmadaki sonuçlara benzer sonuçlar Eskin ve Bozdoğan 2021 [71] tarafından elde edilmiştir. Söz konusu çalışmada, 38 nm boyutlu ve pul benzeri şekilli bakır oksit NP'leri (10, 50, 100, 150 µg/10 ul/larva) konsantrasyonlarında dördüncü evre (100 ± 20 mg) *G. mellonella* larvalarına zorla besleme yöntemiyle verilmiştir. Canlı hemositlerin oranı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 24 saat ve 72 saat içinde 50, 100, 150 µg/10 µl konsantrasyonlarda azalmıştır. Mikroçekirdekli hemosit yüzdesindeki artışlar, 24 saat içinde 150 µg/10 µl'de istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Sonuçlar, bakır oksit NP'lerinin yüksek konsantrasyonlarının (>10 µg/10 µl) 24 saat içinde apoptotik hemosit yüzdesini arttırdığını göstermiştir. 100 ve 150 µg/10 µl bakır oksit NP'leri 24 saat içinde nekrotik hemosit yüzdesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Apoptotik hemositlerin oranı 100 ve 150 µg/10 µl bakır oksit

NP'ye maruz kalan larvalarda 72 saat içinde kontrol grubu larvalarına kıyasla artmış ve daha yüksek bulunmuştur. Son olarak, 72. saatte 150 µg/10 µl'de nekrotik hemosit yüzdesinde bir artış gözlemlenmiştir. Dolayısıyla söz konusu çalışmada elde edilen bulgular bu çalışmada, Tablo 4.4.'te yer alan verilerle uyum göstermektedir. Aynı araştırmacılar artan apoptotik ve nekrotik indeksin nedeninin moleküler mekanizmalardan kaynaklı olabileceğini (DNA hasarı, ROS molekülleri, ölüm reseptörü ve/veya intrinsik mitokondriyal yollar vb.), artan konsantrasyona bağlı olarak *G. mellonella*'nın mikronükleus içeren hemosit yüzdesindeki önemli artışın nedeninin ise kromozomal hasarlardan kaynaklı olabileceğini bildirmişlerdir (Eskin ve Bozdoğan 2021) [71]. Biz de artan demir oksit nanopartikül konsantrasyonlarına bağlı olarak artan apoptotik, nekrotik ve mikronükleus içeren hemosit yüzdesinin nedeninin Eskin ve Bozdoğan 2021 [71] tarafından belirtilen nedenlerden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmada sonuçları ile uyum gösteren başka bir çalışmada, Meng ve ark. 2017 [25], gümüş NP'lerin, *B. mori*'de protein metabolizmasını ve metabolik yolları düzenleyerek oksidatif strese karşı direncini azalttığını, hücre apoptozunu etkilediğini ve hücre nekrozunu indüklediğini göstermişlerdir.

SONUÇ

Bu çalışmada, küresel morfolojiye sahip, manyetik demir oksit nanopartikülü (Fe_3O_4 NP)'nün bir deney model hayvanı olan *G. mellonella* üzerindeki toksik etkileri araştırıldı. Deneylerde kullanılacak olan sublethal konsantrasyonların belirlenebilmesi için LC_{50} ve LC_{90} değerleri belirlenmiştir. Bunun için 7 farklı Fe_3O_4 Np konsantrasyonu (1, 10, 50, 100, 200, 400 $\mu g / 10$ ul / larva dozu ve kontrol) 6. dönem (180 ± 20 mg) larvalara (1, 10, 50, 100, 200, 400 $\mu g / 10$ ul / larva) konsantrasyonlarında olmak üzere oral yoldan zorla-besleme tekniği (force-feeding) ile verilmiştir. Elde edilen LC_{50} değerlerine göre de sublethal demir oksit NP konsantrasyonları olarak (0,4, 2, 10, 50, 250 $\mu g / 10$ μl) konsantrasyonları belirlenmiş ve deneysel çalışmalar bu konsantrasyon değerlerine göre gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmalarda (Fe_3O_4 NP)'nün *G. mellonella*'nın biyolojisine, hemosit sayısına, hemositlerde meydana gelen apoptotik, nekrotik ve mitotik indekslere, hemosit canlılığına ve mikronükleus oluşumuna etkileri araştırılmıştır. Sonuçlara göre böceğin biyolojik gelişim evrelerinden pupa gelişim süresi ve ergin gelişim sürelerinde kontrol grubuna göre en yüksek demir oksit NP konsantrasyonunda bir artış gerçekleştiği, yine artan Fe_3O_4 NP konsantrasyonun etkisiyle pupa ağırlığı ortalamasında bir artış gözlemlendiği anlaşılmıştır. Bu sonuçlara ilaveten, artan demir oksit NP konsantrasyonlarına bağlı olarak larvaların hemosit sayıları ortalamalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma gösterdiği anlaşılmıştır. 10, 50 ve 250 $\mu g / 10$ μl Fe_3O_4 NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvalarda canlı hücre %'si azalma göstererek kontrol grubu ile arasındaki fark önemli düzeyde bulunmuştur. Apoptotik hücrelerin % durumları; kontrol grubu ile diğer demir oksit NP konsantrasyonlarına göre kıyaslandığında, 10, 50 ve 250 $\mu g / 10$ μl Fe_3O_4 NP konsantrasyonlarına maruz kalan larvaların apoptotik hücre %'leri, 50 ve 250 $\mu g / 10$ μl Fe_3O_4 NP konsantrasyonuna maruz kalan larvalarda nekrotik hemosit hücre %'leri, son olarak 10 ve 50 $\mu g / 10$ μl Fe_3O_4 NP konsantrasyonuna maruz kalan larvalarda mikronükleus içeren hemositlerin %'leri kontrol grubuna göre artış göstererek istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur.

Elde edilen bu veriler ve *G. mellonella*'nın memelilerle benzer bağışıklık sistemine sahip, kolay ulaşılabilir, yetiştirilmesinde ve toksisite deneylerinde maliyetinin az olması gibi avantajlı yönleri birlikte düşünüldüğünde, gerçekleştirilen bu çalışma önem arz etmektedir. Bu özelliklere ek olarak; böceklerle memelilerin fizyolojik benzer özellikleri, detoksifikasyon mekanizmaları, immün sistemlerinin birçok konuda benzerlik gösterdiği de bilinmektedir. NP'lerin *G. mellonella* üzerinde neden olduğu toksik etkiler ve bu etkilerin belirlenmesine yönelik yapılan toksisite çalışmalarının, demir oksit NP'lerin olası çevre kirliliğinin araştırılmasında ve

yönetilmesinde, gelecekte yapılacak diğer çalışmalara yön gösterecektir. Bu tez çalışmasında, kullanılan model deney organizmasına ilaveten, başka türler üzerinde de NP'lerin fizyolojik etkileri, enkapsülasyon ve nodülasyon mekanizmalarına etkileri, fagositik aktiviteye, total lipit ve karbonhidrat miktarlarına, yumurta verimliliğine ve yumurta açılımına etkileri araştırılarak yeni verilerin ortaya konulabilecektir. Son olarak, farklı boyutlara sahip NP'lerin canlıların biyolojik sistemleri üzerine etkileri de araştırılabilir. Bu konuda gerçekleştirilen çalışmalardan, Liu ve ark. (2010) [112], farklı boyutlardaki üç gümüş gümüş NP'nin (SNP (Silver Nanoparticle)-5, SNP-20 ve SNP-50 (yaklaşık olarak, 5, 20 ve 50 nm)) dört insan hücre modeli (A549, SGC-7901, HepG2 ve MCF-7) üzerindeki sitotoksik etkilerini (hücre morfolojisi, hücre canlılığını, membran bütünlüğü, oksidatif stres, hücre döngüsü devamı) araştırmışlardır. Gözlemlenebilir zararlı etkiler, SNP-5 ve SNP-20 uygulamalarında indüklenmiştir. Gümüş NP'ler, ROS seviyelerini hücrelerde arttırmış ve hücreler S fazında tutuklu kalmıştır. Hücrelerin %4-9'unda apoptoz meydana gelmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, hücrelerinde daha yüksek toksik etkilerin görülmesinin nedenini küçük boyutlu NP'ler olmaları şeklinde yorumlamışlardır.

KAYNAKÇA

1. Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K., “Nanomaterials and nanoparticles”, *Sources and toxicity: Biointerphases*, 2(4), MR17–MR71, 2007.
2. The Royal Society, 2004. Nanoscience and nanotechnologies, The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, London, syf:5.
3. Nikalje, A. P., “Nanotechnology and its Applications in Medicine”, *Medicinal Chemistry*, Volume 5(2), 081-089, 2015.
4. Strambeanu, N., Demetrovici, L., Dragos, D., Lungu, M., “General Overview, Nanoparticles: Definition, Classification and General Physical Properties, Chapter 1”, Springer International Publishing Switzerland, 2015.
5. Feynman, R. P., “Atom is a Small World, *There’s Plenty of Room at the Bottom*, Engineering and Science, Syf:36, 1960.
6. Hulla, J., Sahu, S., Hayes, A., “Nanotechnology”, *Human & Experimental Toxicology*, 34(12), 1318–1321, 2015.
7. Iijima, S., “Helical microtubules of graphitic carbon”, *Nature*, 354(6348), 56–58, 1991.
8. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I., “Nanoparticles: Properties, applications and toxicities”, *Arabian Journal of Chemistry*. 2017.
9. Astefanei, A., Núñez, O., Galceran, M. T., “Characterisation and determination of fullerenes: A critical review”, *Analytica Chimica Acta*, 882, 1–21, 2015.
10. Elliott, J. A., Shibuta, Y., Amara, H., Bichara, C., Neyts, E. C., “Atomistic modelling of CVD synthesis of carbon nanotubes and graphene”, *Nanoscale*, 5(15), 6662, 2013.
11. Gade, A. K., Bonde, P., Ingle A. P., Marcato P. D., Duran N., Rai M. K., “Biobased Mater”, *Bioenergy*, 243-245, 2007.
12. Khandel, P., Shahi, K. S., “Microbes mediated synthesis of metal nanoparticles: current status and future prospects”, *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(1): s. 1-24, 2016.
13. Hulkoti, N. I., Taranath, T. C., “Biosynthesis of nanoparticles using microbes—A review. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces”, s. 121, s. 474–483, 2014.
14. Mittal, A. K., Chisti, Y., Banerjee, U. C., “Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts”, *Biotechnology Advances*, 31(2), s. 346–356, 2013.
15. Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L., O’Connor, C. J., “Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles”, *Chemical Reviews*, 104(9), s. 3893–3946, 2004.

16. Sigmund, W., Yuh, J., Park, H., Maneeratana, V., Pyrgiotakis, G., Daga, A., ... Nino, J. C., "Processing and Structure Relationships in Electrospinning of Ceramic Fiber Systems", *Journal of the American Ceramic Society*, 89(2), s. 395–407, 2006.
17. Murray, C. B., Kagan, C. R., & Bawendi, M. G., "Self-Organization of CdSe Nanocrystallites into Three-Dimensional Quantum Dot Superlattices", *Science*, 270(5240), 1335–1338, 1995.
18. Sun, S., "Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices", *Science*, 287(5460), s. 1989–1992, 2000.
19. Rajavat, S., Qureshi, S.M., "Comparative Study on Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles, Synthesized Using Green Technology, in Combination with Antibiotics on *Salmonella typhi*", *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3, s. 480-485, 2012.
20. Armstrong, N., Ramamoorthy, M., Lyon, D., Jones, K., Duttaroy, K., "Mechanism of Silver Nanoparticles Action on Insect Pigmentation Reveals Intervention of Copper Homeostasis", *Plos One*, 8(1): e53186, 2013.
21. Çiftçi, H., Türk, M., Tamer, U., Karahan, S., Menemen, Y., "Silver Nanoparticles: Cytotoxic, Apoptotic, and Necrotic Effects on MCF-7 Cells", *Turkish Journal of Biology*, 37(5), s. 573-581, 2013.
22. Hassani, A., Tajali, A. A., Mazinani, S. M. H., "Studying the Conventional Chemical Fertilizers and Nano-Fertilizer of Iron, Zinc and Potassium on Quantitative Yield of the Medicinal Plant of Peppermint (*Mentha piperita* L.) in Khuzestan", *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, Volume 3, Issue 4, ISSN (Online) 2319-1473, 2015.
23. Madhiyazhagan P., Murugan K., Kumar A.N., Nataraj T., Dinesh D., Panneerselvam C., Subramaniam J., Kumar P.M., Suresh U., Roni M., Nicoletti M., Alarfaj A.A., Higuchi A., Munusamy M.A., Benelli G., "Sargassum muticum-Synthesized Silver Nanoparticles: An Effective Control Tool Against Mosquito Vectors and Bacterial Pathogens", *Parasitology Research*, 114(11), s. 4305 – 4317, 2015.
24. Zorlu, T., "Farklı Dozlardaki Titanyum Dioksit (TiO₂) Nanopartikülünün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Biyolojisine ve Enzim Sistemine Etkisi", *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s. 1-87, 2016.
25. Meng X., Abdlli N., Wang N., Lü P., Nie Z., Dong X., Lu S., Chen K., "Effects of Ag Nanoparticles on Growth and Fat Body Proteins in Silkworms (*Bombyx mori*)", *Crossmark*, 180, s. 327–337, 2017.
26. Eskin, A., Öztürk, Ş., Körükçü, M., "Determination of The Acute Toxic Effects of Zinc oxide Nanoparticles (ZnO NPs) in Total Hemocytes Counts of *Galleria mellonella* (Lepidoptera:

- Pyralidae) with two different methods”, *Ecotoxicology*, 28, 7, s. 801–808, 2019.
27. Durular G. G., “Alüminyum Klorürün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)’nın Bağışıklık Sistemine Etkileri”, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, s. 1-103, 2019.
28. Eskin, A., Bozdoğan, H., “Effects of the Copper Oxide Nanoparticles (CuO NPs) on *Galleria mellonella* Hemocytes”, *Drug and Chemical Toxicology*, 2020.
29. Taştan Ertit B., Durukan Kars İ., Ateş M., “*Chlorella* Sp. ve *Daphnia magna* Üzerinde Demir Oksit Nanopartiküllerinin Ekotoksikite Çalışması”, *Politeknik Dergisi*, 2020.
30. Fu, C., Ravindra, N. M., “Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and applications. Bioinspired”, *Biomimetic and Nanobiomaterials*, 1(4), s. 229-244, 2012.
31. Rahman, M. M., Khan, S. B., Jamal, A., Faisal, M., Aisiri, A. M., “Iron oxide nanoparticles”, *Nanomaterials*, 3, s. 43-67, 2011.
32. Sakallıoğlu, H., “Manyetik nanopartiküller üzerine desteklenmiş Schiff bazı türevi metal komplekslerinin sentezleri ve katalitik etkinliklerinin incelenmesi”, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 2013.
33. Babes, L., Denizot, B., Tanguy, G., Le Jeune, J. J., Jallet, P., “Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 212(2), s. 474–482, 1999.
34. Behera, S. S., Patra, J. K., Pramanik, K., Panda, N., & Thatoi, H., “Characterization and evaluation of antibacterial activities of chemically synthesized iron oxide nanoparticles”, *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2, s. 196-200, 2012.
35. Tang, S. C., Lo, I. M., “Magnetic nanoparticles: essential factors for sustainable environmental applications”, *Water research*, 47(8), 2613-2632, 2013.
36. Askary, M., Talebi S. M., Amini F., Balout Bangan A. D., “Effect of NaCl and Iron Oxide Nanoparticles on *Mentha piperita* Essential Oil Composition”, *Environmental and Experimental Biology*, 14: 27–32, 2016.
37. Murugan K., Dinesh D., Nataraj D., Subramaniam J., Amuthavalli P., Madhavan J., Rajasekar A., Rajan M., Thiruppathi K. P., Kumar S., Higuchi A., Nicoletti M., Benelli G., “Iron and iron oxide nanoparticles are highly toxic to *Culex quinquefasciatus* with little non-target effects on larvivorous fishes”, *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10504-10514, 2018.
38. Kanagasubbulakshmi, S., Kadirvelu, K., “Green synthesis of iron oxide nanoparticles using *Lagenaria siceraria* and evaluation of its antimicrobial activity”, *Defence Life Science Journal*, 2(4), 422-427, 2017.

39. Gaharwar, U. S., Meena, R., Rajamani, P., “Iron oxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in lymphocytes”, *Journal of Applied Toxicology*, 37(10), 1232-1244, 2017.
40. Praveen, A., Khan, E., Ngiime D, S., Perwez, M., Sardar, M., & Gupta, M., “Iron Oxide Nanoparticles as Nano-adsorbents: A Possible Way to Reduce Arsenic Phytotoxicity in Indian Mustard Plant (*Brassica juncea* L.), *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(2), 612–624, 2017.
41. Uysal, Y., Belibağlı P., “Pektin-nano Manyetik kompozit (Pektin-Fe₃O₄) Kullanılarak Sulardan Nonilfenol Etoksilatların Giderilmesi”, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 25(8), 929-937, 2019.
42. Sarıbuğa, S., “Manyetik nanopartiküllerin analitik incelenmesi”, İstanbul Teknik Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, 2014.
43. Dağlıoğlu, Y., Yılmaz, H., Ö., “Nanopartikül karakterizasyon yöntemleri ve ekotoksikite deneylerindeki önemi”, *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 30(1), s. 1-17, 2018.
44. Er, A., “Endparazitoit *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae) zehiri ve parazitlenmesinin konak hemositlerine etkileri, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yayınlanmamış doktora tezi, 2011.
45. Brey, P. T., Lee, W. J., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., Francois, M., & Ashida, M., “Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13), s. 6275–6279, 1993.
46. Russell, V., Dunn, P. E., “Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis”, *Journal of Insect Physiology*, 42(1), s. 65–71, 1996.
47. Strand, M. R., Beck, M. H., Lavine, M. D., Clark, K. D., “*Microplitis demolitor* bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*”, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 61(3), s. 134–145, 2006.
48. Öztürk, G., Çakıcı, Ö., Arıkan, H., “Morphological characterization of hemocyte types in some species belonging to Tettigoniidae and Pamphagidae (Insecta: Orthoptera)”, *Turkish Journal of Zoology*, 42(3), s. 340-345, 2018.
49. Miranpuri, G. S., Bidochka, M. J., Tourians, G. K. G., “Morphology and Cytochemistry of Hemocytes and Analysis of Hemolymph from *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera: Acrididae)”, *Journal of Economic Entomology*, 84(2), s. 371–378, 1991.
50. Capinera, J. L., Crist, T. O., Heppner, J. B., Tzanakakis, M. E., Gayubo, S. F., Tartar, A., ... Hernández, S., “Hemocytes of Insects: Their Morphology and Function”, *Encyclopedia of*

- Entomology*, 1787–1790, 2008.
51. Tunçsoy, B., Kara, A., Özalp, P., “Cu, Zn ve Karışımlarının *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Hemosit Tipleri ve Sayıları Üzerine Etkileri”, *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 5(1), s. 45-51, 2020.
 52. Lavine, M. D., Strand, M. R., “Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple alpha and beta integrin subunits”, *Insect Molecular Biology*, 12(5), s. 441–452, 2003.
 53. Hüdaverdi, S., “*Melanogryllus desertus* (Pallas 1771) (Orthoptera: Gryllidae)’da 2, 4-D (Diklorofenoksiasetik asit)’nin testise etkileri”, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2011.
 54. Ribeiro C., Brehelin M., “Insect haemocytes: What type of cell is that?”, *J Insect Physiol.*, 52, s. 417-429, 2006.
 55. Kaya, S., “Konağa verilen indol-3-asetik asitin ve kaliks sıvısının konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ve parazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) hemositlerine etkisi”, T.C. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 2015.
 56. Levin, D.M., “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, PhD Thesis, 2007.
 57. Rowley, A.F., Ratcliffe, N.A., “Insects, In: Invertebrate Blood Cells”, *Academic Press*, 2, s. 421-488, 1981.
 58. Ribeiro, C. and Brehelin, M., “Insect haemocytes: What type of cell is that?”, *J Insect Physiol.*, 52, s. 417-429, 2006.
 59. Chapman, R.F., “The Insects: Structure and Function”, *Cambridge University Press*, 1998.
 60. Gupta, A.P., “Cellular elements in the hemolymph In: Comprehensive insect physiology”, biochemistry and pharmacology, Pergamon Press, s. 401-451, 1985.
 61. Kurt, D., “Piretoit grubu insektisit deltametrinin *Galleria mellonella* L’nin hemositleri üzerine etkileri”, *Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, 2013.
 62. Yılmaz, E. “Farklı Dozlardaki alüminyum klorür’ün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: pyralidae)’nın Biyolojisine ve Hemosit sayılarına Etkileri”, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 2013.
 63. Çelik, D., Özbek, R., Uçkan, F., “Effects of indole-3-acetic acid on hemocytes of *Achoria grisella* Fabr. (Lepidoptera: Pyralidae)”, *Journal of the Entomological Research Society*, 19(2), 83-93, 2017.
 64. Yücel, M. S., “İmidakloprid’in *Galleria mellonella*’nın bazı biyokimyasal parametrelerine

- ve hemositleri üzerine etkileri”, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2017.
65. Gwokyalya, R., Altuntaş, H., “Boric acid-induced immunotoxicity and genotoxicity in model insect *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *Archives of insect biochemistry and physiology*, 101(4), 2019.
66. Köse, B., “Zebularinin Konak *Galleria mellonella* ve Endoparazitoid *Pimpla turionelleda*'nın Yaşam Döngüsü ile Konak Hemositlerine Etkileri”, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2019.
67. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics”, *Br J Cancer*, 26(4), s. 239–57, 1972.
68. Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW, “Apaf-1 and caspase-9 in p53- dependent apoptosis and tumor inhibition”, *Science*, 284(5411), s. 156–59, 1999.
69. D’Arcy, M., “Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy”, *Cell Biology International*, 2019.
70. Altuntaş, H., Kılıç, A. Y., Uçkan, F., Ergin, E., “Effects of Gibberellic Acid on Hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae).”, *Environmental Entomology*, 41(3), s. 688–696, 2012.
71. Eskin, A., Bozdoğan, H., “Effects of the copper oxide nanoparticles (CuO NPs) on *Galleria mellonella* hemocytes”, *Drug and Chemical Toxicology*, 2021.
72. Mir, A. H., Qamar, A., Qadir, I., Naqvi, A. H., Begum, R., “Accumulation and trafficking of zinc oxide nanoparticles in an invertebrate model, *Bombyx mori*, with insights on their effects on immuno-competent cells”, *Scientific reports*, 10(1), 1-14, 2020.
73. Ottoni, C. A., Maria, D. A., Gonçalves, P. J. R. D. O., De Araújo, W. L., De Souza, A. O., “Biogenic *Aspergillus tubingensis* silver nanoparticles’ in vitro effects on human umbilical vein endothelial cells, normal human fibroblasts, HEPG2, and *Galleria mellonella*”, *Toxicology research*, 8(6), 789-801, 2019.
74. Kwadha, C. A., Ong’amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K., Fombong, A. T., “The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*”, *Insects*, 8(2), 61, 2017.
75. Harding, C. R., Schroeder, G. N., Collins, J. W., Frankel, G., “Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection”, *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (81), 2013.
76. Mikulak, E., Gliniewicz, A., Przygodzka, M., Solecka, J., “*Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies”, *Przegl. Epidemiol*, 72, s. 57-73, 2018.

77. Özer, M., “Arı kovanlarında önemli zarar yapan balmumu güvesi *Galleria mellonella* L'nin morfoloji, biyoloji ve yayılışı üzerine araştırmalar”, *Bitki Koruma Bülteni*, 2, 12-26, 1962.
78. Allan, L., “Wax Moth and its Control”, *Department of Agriculture Western Australia*, 2000.
79. Cymborowski, B., “Temperature-dependent regulatory mechanism of larval development of the wax moth (*Galleria mellonella*)”, *Acta biochimica polonica*, 47(1), s. 215-221, 2000.
80. Akyol, E., “Mum Güvesi (*Galleria Mellonella* L.) Zararı ve Kontrol Yöntemleri”, *Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Arıcılık Araştırma Dergisi*, 2013.
81. Avan, M., Uğur, A., “Farklı Yapay Besin Ortamlarının *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Galleriidae)'nın Gelişimine Etkisi”, *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7(1), s. 39-46, 2019.
82. Eskin, A., Öztürk, Ş., Körükçü, M., “Determination of the acute toxic effects of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) in total hemocytes counts of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) with two different methods”, *Ecotoxicology*, 28(7), s. 801-808, 2019.
83. Eskin, A., “Çinko Oksit (ZnO) ve Gümüş (Ag) Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera:Pyralidae) Üzerindeki Toksik Etkilerinin Belirlenmesi”, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2017.
84. Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, K., Yokoo, S., “Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*”, *Journal of Insect Physiology*, 46, 1129-1135, 2000.
85. Teramoto, T., Tanaka, T. Teramoto, T., Tanaka, T., “Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*”, *Journal of Insect Physiology*, 50, 1103–1111, 2004.
86. Er, A., “Endoparazitoit *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae) Zehiri ve Parazitlemesinin Konak Hemositlerine Etkileri”, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, s. 42-93, 2011.
87. Yılmaz, E., “Farklı Dozlardaki alüminyum klorür'ün *Galleria mellonella* (l.) (lepidoptera: pyralidae)'nın Biyolojisine ve Hemosit sayılarına Etkileri”, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, 2013.
88. Richardson, R.T., “Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities”, *Apidologie*, 49 (3), s. 397–410, 2018.
89. Venier, P., Maron, S., and Canova, S., “Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 390 (1-2), s. 33–44, 1997.
90. Bolognesi, C., “Micronucleus experiments with bivalve mollusks. In: S. Knasmüller and M.

- Fenech, eds. The micronucleus assay in toxicology”, *London: Royal Society of Chemistry*, Chapter 17, s. 273–289, 2019.
91. Amaral IMR, Neto JFM, Pereira GB, Franco MB, Beletti ME, Kerr WE, Bonetti AM, Ueira-Vieira C., “Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis”, *Micron*, 41, s. 123-129, 2010.
 92. Ghasemi, V., Moharramipour, S., Sendi, J. J., “Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep: Pyralidae) and their response to thermal stress”, *Invertebrate Survival Journal*, 10(1), s. 128-140, 2013.
 93. Manna, M, Bhave, K, Pathak, A. S., “Adhesive scale formation on low silicon steel surface; characterization and mechanism”, *ISIJ International*, 2021.
 94. Tunçsoy, B., “Bakır oksit nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* larvaları üzerine immün ve metabolik etkileri”, *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 10(1), s. 53-60, 2020.
 95. Pappus, S. A, Mishra, M., “A drosophila model to decipher the toxicity of nanoparticles taken through oral routes”, *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*, s. 311-322, 2018.
 96. Malhotra, N, Lee, J. S, Liman, R. A. D, Ruallo, J. M. S, Villaflores, O. B, Ger, T. R, Hsiao, C. D., “Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles”, A review. *Molecules*, 25(14), s. 3159, 2020.
 97. Yasur, J, Rani, P. U., “Lepidopteran insect susceptibility to silver nanoparticles and measurement of changes in their growth, development and physiology”, *Chemosphere*, 124, s. 92-102, 2015.
 98. Shinoda, T., “Methyl farnesoate. In Handbook of Hormones”, *Academic Press*, s. 566-e100, 2016.
 99. Tüven, A., “Farklı dozlarda konağa verilen gibberellik asitin parazitoit *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae) biyolojisine etkileri”, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, 2006.
 100. Bag, J., Mukherjee, S., Ghosh, S. K., Das, A., Mukherjee, A., Sahoo, J. K., ... Mishra, M., “Fe₃O₄ coated guar gum nanoparticles as non-genotoxic materials for biological application”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, s. 333-345, 2020.
 101. Naz, S., Nawaz, H., Arshad, U., Ansari, F., & Shahzadi, R., “Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles and Valuation of their Antimicrobial Activity against Dengue Larvae”, *J Plant Pathol Microbiol*, 8(418), s. 2, 2017.
 102. Ersöz, Ç., Çolak, D. A., “Meyve Sineği Larvalarında SiO₂ Nanopartikülünün Toksikite

- Değerlendirmesi”, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(2), s. 255-262, 2018.
103. Park, E. J., Choi, D. H., Kim, Y., Lee, E. W., Song, J., Cho, M. H., ... & Kim, S. W., “Magnetic iron oxide nanoparticles induce autophagy preceding apoptosis through mitochondrial damage and ER stress in RAW264. 7 cells”, *Toxicology in Vitro*, 28(8), s. 1402-1412, 2014.
104. Eskin, A., Ekremoglu, M., Altinkaynak, C., Özdemir, N., “Effects of organic-inorganic hybrid nanoflowers’ framework on hemocytes and enzymatic responses of the model organism, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)”, *International Journal of Tropical Insect Science*, 1-12, 2021.
105. George PJE, Ambrose D, “Impact of insecticides on the hemogram of *Rhynocoris kumarii* ambrose and livingstone (Hem., Reduviidae)”, *J Appl Entomol* 128:600–604, 2004.
106. Kurt D, Kayış T, “Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*”, *Turkish Journal of Zoology*, 39:452–457, 2015.
107. King JG, Hillyer JF, “Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection.”, *BMC Biol* 11:55, 2013.
108. Nicotera P, Bernassola F, Melino G., “Regulation of the apoptosis-necrosis switch”, *Oncogene*, 23(16), 2757-2765, 2004.
109. Golstein P, Kroemer G., “Cell death by necrosis: towards a molecular definition”, *Trends Biochem Sci*, 32(1), 37-43, 2007.
110. Coşkun, G., Özgür, H., “Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması”, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158, 2011.
111. Atlı-Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. 2011. Genetik toksisite testleri. TÜBAV Bilim Dergisi, 4 (3): 221-229.
112. Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, H.C., Wang, T., Liao, C.Y., Cui, L., Zhou, Q.F., Yan, B., Jiang, G.B., “Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size”. *Nanotoxicology*, 4(3), 319-30, 2001.