

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ALÜMİNYUM OKSİT VE POLİSTİREN
NANOPARTİKÜLLERİNİN *Galleria melonella*'NİN EPİGENETİK
MEKANİZMALAR VE İMMÜN SİSTEMİNE ETKİLERİ

ZÜLBİYE DEMİRTÜRK

KOCAELİ 2024

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ALÜMİNYUM OKSİT VE POLİSTİREN
NANOPARTİKÜLLERİNİN *Galleria melonella*'NİN EPİGENETİK
MEKANİZMALAR VE İMMÜN SİSTEMİNE ETKİLERİ

ZÜLBİYE DEMİRTÜRK

Dr. Öğr. Üyesi Fevzi UÇKAN	
Danışman, Kocaeli Üniv.	
Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ	
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.	
Dr. Öğr. Üyesi SERAP MERT	
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.	
Prof. Dr. Olga SAK	
Jüri Üyesi, Balıkesir Üniv.	
Prof. Dr. Aylin ER	
Jüri Üyesi, Balıkesir Üniv.	

Tezin Savunulduğu Tarih: 08.02.2024

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez/proje çalışmasında,

- Bu tezin/projenin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu,
- Çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı,
- Bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğim ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi,
- Bu çalışmanın Kocaeli Üniversitesi'nin abone olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun olduğunu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Tezin/Projenin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez/proje çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

Bu tez/proje çalışması kapsamında üretilen veri ve bilgiler Kocaeli Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBA-2022-2813 no'lu ve TÜBİTAK 1002-B Acil Destek Modülü tarafından 223Z187 no'lu projeler kapsamında desteklenmiştir.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Zülbiye DEMİRTÜRK

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/projemin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda belirtilen koşullarla kullanıma açma izninin Kocaeli Üniversitesi'ne verdiğimi beyan ederim. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları bende kalacak, tezimin/projemin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki makale, kitap, tebliğ, lisans, patent gibi çalışmalarda kullanımı, danışmanımın isim hakkı saklı kalmak koşuluyla ve her iki tarafın bilgisi dâhilinde bana ait olacaktır.

Tezin/projenin kendi özgün çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin/projenin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim kurulu tarafından yayınlanan “***Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge***” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi/ Kocaeli Üniversitesi Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

Tezim/projem ile ilgili gizlilik kararı verilmemiştir.

Zülbiye DEMİRTÜRK

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmamızda alüminyum oksit ve polistiren nanopartiküllerinin büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* larvaları üzerinde en önemli epigenetik modifikasyonlar arasında yer alan DNA metilasyonu ile hücrel ve hümoral bağışıklık yanıtları üzerindeki etkileri incelendi. Aynı zamanda ebeveyn ve yavru nesil olmak üzere iki nesildeki etkileri incelenerek epigenetik ve transkripsiyonel aktarım hakkında bilgiler elde edildi. Elde edilen verilerle günümüz sanayisinde ve birçok alanda sıklıkla kullanılmakta olan alüminyum oksit ve polistiren nanopartiküllerinin konak *Galleria mellonella*'da epigenetik modifikasyonlara neden olduğu ve bağışıklık sisteminde meydana gelen toksisitesi gösterilerek nano-biyo-etkileşimler değerlendirildi.

Doktora eğitimim süresince bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen ve tecrübelerini aktarmaktan hiçbir zaman çekinmeyen kıymetli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fevzi UÇKAN'a,

Çalışmanın gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan FBA-2022-2813 numaralı proje ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve 223Z187 numaralı proje ile T B TAK 1002-B Acil Destek Modülü'ne,

Doktora tez sürecimde Y K 100-2000  ncelikli Alanlar projesi ile dört yıl süresince beni destekleyen Y K'e,

Tez çalışmam boyunca rehberlikleri ve gösterdikleri özverili çabaları için değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Serap MERT ve Prof. Dr. Olcay MERT'e,

Tez çalışmamı tamamlarken birikimi, deneyimleri ve yol göstericiliği için kıymetli hocam Sayın Arş. Gör. Dr. Serhat KAYA'ya,

Çalışmalarımı sürdürürken yardımlarını ve desteklerini hissettiren değerli arkadaşım Arş. Gör. Famil YUSUFOğLU'na,

Doktora eğitimim boyunca rehberlikleri ve destekleri için Biyoloji Bölümünde görev alan değerli tüm hocalarıma,

Beni her zaman destekleyip, hayatımın her anında yanımda olan ve bana g   veren sevgili annem, babam, kardeşim ve eşime içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

şubat – 2024

Zülbiye DEM RT RK

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ.....	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Epigenetik Mekanizmalar	9
2.1.1. DNA Metilasyonu	12
2.1.2. Post-Translasyonel Modifikasyonlar.....	15
2.1.3. RNA Tabanlı Mekanizmalar	16
2.2. Bağışıklık Sistemi.....	16
2.2.1. Böceklerde Hücresel Bağışıklık Yanıtı	17
2.2.2. Böceklerde Hümorale Bağışıklık Yanıtı	21
2.3. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması	27
2.4. Nanopartiküllerin Özellikleri, Kullanım Alanları, Oluşumları ve Etkileri	29
2.4.1. Alüminyum Oksit Nanopartiküller.....	32
2.4.2. Polistiren Nanopartiküller	36
2.5. <i>Galleria mellonella</i>	39
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	44
3.1. Konak Stok Kültür	44
3.2. Alüminyum Oksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	44
3.3. Polistiren Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	45
3.4. Letal Konsantrasyon 50 (LC ₅₀) Değerleri.....	46
3.5. DNA Metilasyonu.....	48
3.5.1. DNA İzolasyonu.....	48
3.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	50
3.5.3. Global DNA Metilasyonu	51
3.6. Bağışıklık Sistemi.....	53
3.6.1. Enkapsülasyon.....	53
3.6.2. Melanizasyon	55
3.6.3. Fenol Oksidaz Aktivitesi	56
3.6.4. Protein Tayini	57
3.7. Gen İfade Analizleri.....	58
3.7.1. RNA İzolasyonu	58
3.7.2. Agaroz Jel Elektroforezi	59
3.7.3. cDNA Sentezi	59
3.7.4. RT-qPCR Analizleri	60
3.8. İstatistiksel Analiz	62
4. BULGULAR	64
4.1. Alüminyum Oksit Nanopartiküllerin Özellikleri ve Karakterizasyonu	64

4.2. Polistiren Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu	65
4.3. Lethal Konsantrasyon 50 (LC ₅₀).....	68
4.4. DNA Metilasyonu.....	69
4.4.1. İzole Edilen DNA'ların Konsantrasyonları, Safılıkları ve Jel Görüntüleri	69
4.4.2. Global DNA Metilasyonu	70
4.5. Enkapsülasyon	76
4.6. Melanizasyon.....	79
4.7. Fenol Oksidaz Aktivitesi	83
4.8. Protein Tayini	84
4.9. Antimikrobiyal Peptitlerin Gen Ekspresyon Analizleri.....	86
4.9.1. RNA İzolatlarının Konsantrasyonları, Safılıkları ve Jel Görüntüleri	86
4.9.2. RT-qPCR Analizleri.....	86
5. TARTIŞMA.....	93
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	114
KAYNAKLAR.....	115
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER.....	147
ÖZGEÇMİŞ.....	149

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Çalışmada uygulanan yöntemlerin genel özeti. A) Birinci ve ikinci nesil larvalarda global DNA metilasyonu analizleri, B) Birinci nesil larvalarda enkapsülasyon ve melanizasyon tepkileri, C) Birinci nesil larvalarda fenol oksidaz aktivitesi, D) Birinci ve ikinci nesil larvalarda AMP'lerin gen ekspresyon analizleri yapıldı. Nanoparçacık solüsyonları ayrı ayrı larvaların besin içeriklerine eklendi ve bu besinle beslenen deney gruplarındaki tüm larvalar ile analizler gerçekleştirildi. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu F0: Birinci nesil, F1: İkinci nesil, PO: Fenol oksidaz	7
Şekil 2.1.	Epigenetik modifikasyonlar. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu.....	11
Şekil 2.2.	Sitozin pirimidin halkasının DNA metiltransferazlar ile 5-metil sitozine metillenme reaksiyonu. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu.....	13
Şekil 2.3.	Böceklerde hücresel doğuştan gelen bağışıklık yanıtı. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu	18
Şekil 2.4.	Böceklerde humoral doğuştan gelen bağışıklık yanıtı. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu	21
Şekil 2.5.	Böceklerde serin proteaz aktivasyonu sonucu melanin oluşumu. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu	23
Şekil 2.6.	Nanopartiküllerin sınıflandırılması. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu.....	28
Şekil 2.7.	Nanoparçacıkların oluşumu ve dağılımı. Fabrika atıkları, metalik ve polimerik atıklar sonucu sıcaklık, basınç, UV gibi etkenlerle oluşan nanoparçacıklar doğal veya antropojenik faaliyetlerle hava, toprak ve su kaynaklarına, oradan da insan ve diğer canlılara geçerek doku, organ ve hücreleri etkilemektedir. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu	32
Şekil 2.8.	Alüminyum oksit kimyasal yapısı A) Alüminyum oksit bileşiği; Al: sarı, O: yeşil, B) korindon benzeri yapı, konvansiyonel altıgen birim hücre; Al: kırmızı, O: gri. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu	34
Şekil 2.9.	Polistirenin kimyasal yapısı ((C ₈ H ₈) _n). Görsel CanvaPro ile oluşturuldu.....	37
Şekil 2.10.	<i>Galleria mellonella</i> yumurtalarının morfolojik görüntüsü, (A) 10 mm'de görüntüsü ve (B) 1 mm'de görüntüsü.....	40
Şekil 2.11.	<i>Galleria mellonella</i> larvalarının morfolojik görüntüsü	40
Şekil 2.12.	<i>Galleria mellonella</i> pupalarının kozalı ve kozasız morfolojik görüntüsü.....	41
Şekil 2.13.	<i>Galleria mellonella</i> (A) dişi ve (B) erkek yetişkinlerin morfolojik görüntüsü.....	42
Şekil 3.1.	Laboratuvarda yetiştirilen stok <i>Galleria mellonella</i> 'nın tüm yaşam evreleri	44
Şekil 3.2.	Polistiren nanopartiküllerinin üretiminde uygulanan aşamalar. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu	46
Şekil 3.3.	Probit analizi için oluşturulan deney gruplarına ait örnekler	47

Şekil 3.4.	Birinci ve İkinci nesil <i>Galleria mellonella</i> larvalarının beslenme ve gelişim şekli. F0: Birinci nesil, F1: İkinci nesil, Görsel CanvaPro ile oluşturuldu	48
Şekil 3.5.	Boncuk enjeksiyonunun 4. ve 24. saatin sonunda disekte edilen larvalarda gözlenen boncukların görüntüsü (Olympus Stereo Microscop 30X büyütme – 100 µm)	53
Şekil 3.6.	PBS ile birlikte enjekte edilen Sephadex A-25 boncuklarının <i>Galleria mellonella</i> larvaları tarafından <i>in vivo</i> enkapsülasyonu gösteren faz kontrast mikroskopik görüntüleri. Her bir larvaya yaklaşık 15-25 boncuk enjekte edildi ve 4-24 saat sonra larvalar disekte edilerek değerlendirildi. Larvalardan çıkarılan tüm boncuklar bu mikrograflara göre değerlendirildi, (A) enkapsüle olmamış boncuk, (B) zayıf enkapsüle olmuş boncuk, (C) güçlü bir enkapsülasyon tepkisinin oluştuğunu gösteren çok sayıda düzleşmiş ve konsantrik olarak düzenlenmiş hemosit tabakası ile çevrilidir, (D) boncuk etrafında düzleşmiş hemosit katmanlarının (ok) varlığını gösteren yüksek güçlü mikrograf (Nikon Ti-U 10X - 10 µm)	54
Şekil 3.7.	PBS ile birlikte enjekte edilen Sephadex A-25 boncuklarının <i>Galleria mellonella</i> larvaları tarafından <i>in vivo</i> melanizasyonunu gösteren faz kontrast mikroskopik görüntüleri. Her bir larvaya yaklaşık 15-25 boncuk enjekte edildi ve 4-24 saat sonra larvalar disekte edilerek değerlendirildi. Larvalardan çıkarılan tüm boncuklar bu görüntülere göre değerlendirildi. Melanizasyon tepkisi; (A) melanize olmamış boncuk, (B) zayıf melanize olmuş boncuk (bu boncukların yüzeyinde $\leq$ %20 kararma), (C) orta derecede melanize olmuş boncuk (bu boncukların yüzeyinde %21-69 kararma) ve (D) güçlü melanize boncuk (bu boncukların yüzeyinde $\geq$ %70 kararma) (Nikon Ti-U 10X - 10 µm)	55
Şekil 3.8.	<i>Galleria mellonella</i> hemolenfinin alındığı ilk abdominal ön bacaklarının ön segmenti. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu	56
Şekil 4.1.	Alüminyum oksit nanopartiküllerin (A) zeta (ζ) potansiyel eğrileri ve mV değerleri, (B) boyut dağılımı eğrileri ve (C) taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (400 nm)	65
Şekil 4.2.	PS NP'lerin boyut dağılımı eğrileri, (A) 20 mg polistirenden sonikasyon ile elde edilen NP boyutu, (B) 25 mg polistirenden sonikasyon ile elde edilen NP boyutu, (C) 20 mg polistirenden homojenizasyon ile elde edilen NP boyutu, (D) 25 mg polistirenden homojenizasyon ile elde edilen NP boyutu	67
Şekil 4.3.	Polistiren nanopartiküllerin, (A) zeta (ζ) potansiyel eğrileri, (B) 5µm skalada taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (C) 1µm skalada taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü	68
Şekil 4.4.	Alüminyum oksit ve polistiren nanopartiküllerin probit analizi grafikleri	69

Şekil 4.5.	İzole edilen DNA'ların jel elektroforez görüntüsü.....	69
Şekil 4.6.	Dezoksi-5-metilsitidin-3'-monofosfat nükleotidine ait kalibrasyon eğrisi	70
Şekil 4.7.	HPLC'de yapılan global DNA metilasyon ölçümüne ait örnek pikler. Standart olarak dezoksi-5-metilsitidin-3'-monofosfat (5m-dCMP) kullanıldı. Kolonda 6,2. dk'da oluşan pik 5m-dCMP pikidir. Larvalardan izole edilen DNA örneklerinde bu dk'da oluşan pik seçildi ve metilasyon konsantrasyonu kalibrasyon eğri denklemi kullanılarak hesaplandı. HPLC kolonu (ACE 3 C8, 125 × 4,0 mm), Akış; 0,75 mL/dk, Mobil faz; 50 mM Amonyum Ortofosfat (pH: 4,1), Absorbans; 280 nm	71
Şekil 4.8.	Alüminyum oksit nanopartiküllerinin birinci (F0) nesil <i>Galleria mellonella</i> larvalarında kontrol grubuna göre metilasyon yüzdelerindeki değişiklikler.....	73
Şekil 4.9.	Alüminyum oksit nanopartiküllerinin ikinci (F1) nesil <i>Galleria mellonella</i> larvalarında kontrol grubuna göre metilasyon yüzdelerindeki değişiklikler.....	73
Şekil 4.10.	Polistiren nanopartiküllerinin birinci (F0) nesil <i>Galleria mellonella</i> larvalarında kontrol grubuna göre metilasyon yüzdelerindeki değişiklikler	75
Şekil 4.11.	Polistiren nanopartiküllerinin ikinci (F1) nesil <i>Galleria mellonella</i> larvalarında kontrol grubuna göre metilasyon yüzdelerindeki değişiklikler	75
Şekil 4.12.	Alüminyum oksit nanopartiküllerin <i>Galleria mellonella</i> larvalarındaki fenol oksidaz aktivitesi üzerindeki etkisi. Absorbans ELISA mikrolaka okuyucuda 490 nm'de 30 dk boyunca 5 dk aralıklarla ölçüldü. Fenol oksidaz aktivitesi absorbans birimi U/mg protein/dk olarak verildi. Veriler toplam 15 larvanın "Ortalama ± Standart Hata"sı şeklinde gösterildi. Grafikte farklı harflerle gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05; Tek yönlü ANOVA, Tukey's HSD)	83
Şekil 4.13.	Polistiren nanopartiküllerin <i>Galleria mellonella</i> larvalarındaki enol oksidaz aktivitesi üzerindeki etkisi. Absorbans ELISA mikrolaka okuyucuda 490 nm'de 30 dk boyunca 5 dk aralıklarla ölçüldü. Fenol oksidaz aktivitesi absorbans birimi U/mg protein/dk olarak verildi. Veriler toplam 15 larvanın "Ortalama ± Standart Hata"sı şeklinde gösterildi. Grafikte farklı harflerle gösterilen gruplar anlamlıdır (p<0,05; Tek yönlü ANOVA, Tukey's HSD).....	84
Şekil 4.14.	Bovin serum albümine ait standart eğri.....	85
Şekil 4.15.	RNA izolatlarının örnek agaroz jel görüntüsü. L: DNA işaretleyici (Ladder)	86
Şekil 4.16.	Birinci nesilde alüminyum oksit nanopartiküllerinin antimikrobiyal peptitler ile ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar β-aktin geni ile normalize edildi ve kontrol gruplarının değeri "1" olarak alındı.	

	Üç farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak veriler hesaplandı. *; Kontrol grubuna göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık görüldü.....	87
Şekil 4.17.	İkinci (yavru) nesilde alüminyum oksit nanopartiküllerinin antimikrobiyal peptitler ile ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar β -aktin geni ile normalize edildi ve kontrol gruplarının değeri “1” olarak alındı. Üç farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak veriler hesaplandı. *; Kontrol grubuna göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık görüldü.....	89
Şekil 4.18.	Birinci (ebeveyn) nesilde polistiren nanopartiküllerinin antimikrobiyal peptitler ile ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar β -aktin geni ile normalize edildi ve kontrol gruplarının değeri “1” olarak alındı. Üç farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak veriler hesaplandı. *; Kontrol grubuna göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık görüldü.....	90
Şekil 4.19.	İkinci (yavru) nesilde polistiren nanopartiküllerinin antimikrobiyal peptitler ile ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar β -aktin geni ile normalize edildi ve kontrol gruplarının değeri “1” olarak alındı. Üç farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak veriler hesaplandı. *; Kontrol grubuna göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık görüldü.....	92

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Global DNA metilasyonunda 5m-dCMP standart eğri konsantrasyonları	51
Tablo 3.2.	DNA nükleotitlerinin hidrolizi için hazırlanan bileşenler.....	52
Tablo 3.3.	cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği	59
Tablo 3.4.	cDNA sentezi için RT-PCR döngüleri	60
Tablo 3.5.	RT-qPCR için hazırlanan reaksiyon içeriği	60
Tablo 3.6.	qRT-PCR ile gen ifadeleri için kullanılan primerler	61
Tablo 3.7.	RT-qPCR döngüleri.....	61
Tablo 3.8.	RT-qPCR analizlerinde primerlerin Tm değerleri	62
Tablo 4.1.	Alüminyum oksit nanopartiküllerin özellikleri	64
Tablo 4.2.	Polistiren nanopartiküllerinin Z-ortalama çapları (nm), polidispersite indeksleri ve elde edilen nanopartikül miktarı (mg).....	66
Tablo 4.3.	Birinci (F0) ve ikinci (F1) nesil <i>Galleria mellonella</i> larvalarında alüminyum oksit nanopartiküllerinin DNA metilasyonu konsantrasyonlarına etkisi	72
Tablo 4.4.	Birinci (F0) ve ikinci (F1) nesil <i>Galleria mellonella</i> larvalarında polistiren nanopartiküllerinin DNA metilasyonu konsantrasyonlarına etkisi	74
Tablo 4.5.	Boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra alüminyum oksit nanopartikülleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarında gerçekleşen enkapsülasyon seviyelerinde değişiklik (%)	76
Tablo 4.6.	Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra alüminyum oksit nanopartikülleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarında gerçekleşen enkapsülasyon seviyelerinde değişiklik (%)	77
Tablo 4.7.	Boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra polistiren nanopartikülleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarında gerçekleşen enkapsülasyon seviyelerinde değişiklik (%)	78
Tablo 4.8.	Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra polistiren nanopartikülleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarında gerçekleşen enkapsülasyon seviyelerinde değişiklik (%)	79
Tablo 4.9.	Boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra alüminyum oksit nanopartikülleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarında gerçekleşen melanizasyon seviyelerinde değişiklik (%)	80
Tablo 4.10.	Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra alüminyum oksit nanopartikülleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarında gerçekleşen melanizasyon seviyelerinde değişiklik (%)	81
Tablo 4.11.	Boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra polistiren nanopartikülleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarında gerçekleşen melanizasyon seviyelerinde değişiklik (%)	82
Tablo 4.12.	Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra polistiren nanopartikülleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarında gerçekleşen melanizasyon seviyelerinde değişiklik (%)	82
Tablo 4.13.	Alüminyum oksit ve polistiren nanopartikül uygulanan deney gruplarında protein konsantrasyonları (mg/mL).....	85

Tablo 4.14.	Birinci (ebeveyn) nesilde alüminyum oksit nanopartiküllerinin gen ifadelerinde kat değişimine etkisi	87
Tablo 4.15.	İkinci (yavru) nesilde alüminyum oksit nanopartiküllerinin gen ifadelerinde kat değişimine etkisi	88
Tablo 4.16.	Birinci (ebeveyn) nesilde polistiren nanopartiküllerinin gen ifadelerinde kat değişimine etkisi	90
Tablo 4.17.	İkinci (yavru) nesilde polistiren nanopartiküllerinin gen ifadelerinde kat değişimine etkisi.....	91



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
/	: Eğik çizgi
:	: İki nokta
;	: Noktalı virgöl
+	: Artı
=	: Eşittir
±	: Artı-eksi
×	: Çarpı
°C	: Derece Celcius (Selsiyus)
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
β	: Beta
Δ _{max}	: Maksimum absorbands
Δ _{min}	: Minimum absorbands
Δ _t	: Toplam süre
ζ	: Zeta potansiyeli
κ	: Kappa
ε	: Ekstinksiyon katsayısı

Kısaltmalar

5m-dCMP	: 2'-dezoksi-5-metilsitidin-3'-monofosfat
A _{260/230}	: 260-230 nm'deki Absorbans
A _{260/280}	: 260-280 nm'deki Absorbans
Ag	: Gümüş
AgNO ₃	: Gümüş Nitrat
Al ₂ O ₃	: Alüminyum Oksit
AMP	: Antimikrobiyal Peptit
ANOVA	: Analysis Of Variance (Varyans Analizi)
ATP	: Adenozin Trifosfat
Au	: Altın
BCA	: Bicinchoninic Acid (Bişinkoninik Asit)
BSA	: Bovin Serum Albümin
CAM	: Chloramphenicol (Kloramfenikol)
CAT	: Catalase (Katalaz)
Cd	: Cadmium (Kadmiyum)
cDNA	: Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
CeO ₂	: Seryum Dioksit
CH ₃	: Metil Grubu
Cu ⁺²	: Bakır İyonu
CuO	: Bakır Oksit
CuSO ₄	: Bakır Sülfat
CuSO ₄ ·5H ₂ O	: Bakır (II) Sülfat Pentahidrat
Ddc	: DOPA Decarboxylase (DOPA Dekarboksilaz)
df	: Degree of Freedom (Serbestlik Derecesi)
dH ₂ O	: Distile Su

dk	: Dakika
DNMT	: DNA Methyltransferase (DNA Metiltransferaz)
EC	: Effective Concentration (Etkili konsantrasyon)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
F0	: Birinci Jenerasyon
F1	: İkinci Jenerasyon
g	: Gram
GO	: Grafen Oksit
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H ₃ PO ₄	: Ortofosforik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
IMD	: Immune Deficiency (NF-κB Bağışıklık Sinyal Yolu)
IMPI	: Inducible Metallo Proteinase Inhibitor (İndüklenebilir Metallo Proteinaz İnhibitörü)
JAK-STAT	: Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (Janus Kinaz/Sinyal Dönüştürücüler ve Transkripsiyon Aktivatörleri)
kg	: Kilogram
L	: Litre
LC	: Lethal Concentration (Lethal Konsantrasyon)
L-DOPA	: 3,4-Dihydroxy- L- Phenylalanine (3,4-Dihidroksi-L-fenilalanin)
LPS	: Lipopolisakkarit
mBar	: Milibar
mL	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
mV	: Milivolt
NaOAc	: Sodyum Asetat
ncRNA	: Non-coding RNA (Kodlanmayan RNA)
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
NP	: Nanopartikül
p38 MAPK	: p38 Mitojenle Aktifleşen Protein Kinazlar
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Patterns (Patojenlerle İlişkili Moleküler Kalıplar)
PAP	: Prophenoloxidase Activating Protease (Profenoloksidaz Aktive Edici Proteaz)
Pb	: Kurşun
PBS	: Phosphate Buffered Solution (Fosfat Tamponlu Salin)
PDI	: Polidispersite İndeksi
PE	: Polietilen
pH	: Potansiyel Hidrojen
PO	: Phenol Oxidase (Fenol Oksidaz)
ppm	: Parts Per Million (mg Çözünen / L Çözelti)

proPO	: Pro Phenol Oxidase (Pro Fenol Oksidaz)
PRR	: Pattern Recognition Receptors (Patern Tanıma Reseptörleri)
PS	: Polistiren
PSP	: Plasmacytocyte Spreading Peptide (Plazmatosit Yayılma Peptidi)
PÜ	: Poliüretan
PVA	: Poli (Vinil Alkol)
RNS	: Reactive Nitrogen Species (Reaktif Nitrojen Türleri)
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RT-qPCR	: Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (Ters Transkripsiyon Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
sAg	: Sülfidize Gümüş
SD	: Standard Deviation (Standart Sapma)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskop)
SH	: Standard Error (Standart Hata)
SiO ₂	: Silisyum Dioksit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
THC	: Total Hemocyte Count (Toplam Hemosit Sayısı)
TiO ₂	: Titanyum Dioksit
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volume (Hacim)
VCM	: Vancomycin (Vankomisin)
W	: Weight (Ağırlık)
ZnO	: Zinc Oxide (Çinko Oksit)

ALÜMİNYUM OKSİT VE POLİSTİREN NANOPARTİKÜLLERİNİN *Galleria melonella*'NİN EPİGENETİK MEKANİZMALAR VE İMMÜN SİSTEMİNE ETKİLERİ

ÖZET

Günümüzde nanopartiküllerin (NP) canlı organizmalarda epigenetik ve immünolojik etkileri ilgi çekmektedir. Özellikle alüminyum oksit (Al_2O_3) ve polistiren (PS) en çok üretilenler arasındadır. NP'ler deri, solunum ve sindirim gibi çeşitli yollarla organizmaya giriş yapabilmektedirler. Deneylerde epigenetik mekanizmaların incelenmesi ve bağışıklık sisteminin anlaşılması için ideal bir model olan *Galleria mellonella* kullanıldı. Bu nedenle Al_2O_3 NP'lerin ve kanserojen etkili stiren monomerlerinden elde edilen nano-PS'lerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki epigenetik ve bağışıklık sistemine etkileri incelendi. Al_2O_3 NP'ler satın alınarak kullanıldı; PS NP'ler ise tekli-emülsiyon yöntemi ile üretildi. Kullanılan NP'ler boyut ve yüzey yükleri karakterize edildi. Al_2O_3 ve PS NP'leri son evre larvalarına farklı konsantrasyonlarda besindeki su içeriği değiştirilerek verildi. Birinci ve ikinci jenerasyonda global DNA metilasyon seviyeleri HPLC ile belirlendi. Hücresel enkapsülasyon, melanizasyon, fenol oksidaz aktivitesi gibi bağışıklık yanıtları sadece birinci jenerasyonda incelendi. Hümmoral bağışıklık yanıtlarından biri olan antimikrobiyal peptitleri oluşturan β -aktin, transferrin, galyomisin ve p38MAPK genlerinin ekspresyon miktarları iki nesilde de RT-qPCR ile belirlendi. Elde edilen veriler ile Al_2O_3 /PS NP'lerin global DNA metilasyonunu arttırdığı, hücresel ve hümmoral bağışıklık yanıtlarını baskıladığı gözlemlendi. Bununla birlikte NP'lerin ebeveyn bireylerde oluşturduğu epigenetik ve bağışıklıkla ilgili gen ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin yavru jenerasyona aktarıldığı tespit edildi. Günümüzdeki Covid-19 salgını göz önünde alındığında, çalışma sonuçlarımız ve bu tür çalışmaların önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Alüminyum Oksit Nanopartikülü, *Galleria melonella*, Global DNA Metilasyonu, Hümmoral ve Hümmoral Bağışıklık, Polistiren Nanopartikülü.

THE IMPACTS OF ALUMINIUM OXIDE AND POLYSTYRENE NANOPARTICLES ON EPIGENETIC MECHANISMS AND IMMUNE SYSTEM OF *Galleria mellonella*

ABSTRACT

Currently, the epigenetic and immunological effects of nanoparticles (NPs) in living organisms are of interest. Aluminium oxide (Al_2O_3) and polystyrene (PS) are among the most produced nanomaterials. NPs can enter the organism via different routes such as skin, respiration, and digestion. *Galleria mellonella*, an ideal model for studying epigenetic mechanisms and understanding the immune system, was used for the experiments. Therefore, the epigenetic and immunological effects of Al_2O_3 and nano-PS derived from carcinogenic styrene monomers on *G. mellonella* larvae were investigated. Al_2O_3 -NPs were purchased and used; PS-NPs were prepared by single-emulsion method. The size and surface charge of the NPs used were characterized. Al_2O_3 and PS-NPs were fed to the last instars at different concentrations, and the water content in the feed was changed. Global DNA methylation levels in the first and second generation were determined by HPLC. Immunoreactions such as cellular encapsulation, melanization and phenol oxidase activity were only examined in the first generation. The expression levels of β -actin, transferrin, galiomycin and p38MAPK genes, which represent antimicrobial peptides, one of the humoral immune responses, were determined by RT-qPCR in two generations. Based on the data obtained, it was found that Al_2O_3 / PS-NPs increased global DNA methylation and suppressed cellular and humoral immune responses. Additionally, the changes in epigenetic and immune-related gene expression levels in the parental individuals caused by NPs were found to be transmitted to the next generation. Considering the Covid-19 pandemic, the results of our study and the importance of such studies are becoming increasingly clear today.

Keywords: Aluminium Oxide Nanoparticle, *Galleria melonella*, Global DNA Methylation, Cellular and Humoral Immunity, Polystyrene Nanoparticle.

1. GİRİŞ

Epigenetik, genetik materyal üzerinde gerçekleşen modifikasyonları ve gen bölgelerinin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmaları oluşturmaktadır (Gibney, ve Nolan, 2010). Bu mekanizmalar global DNA metilasyonu, post-translasyonel modifikasyonlar ve ribonükleik asit (RNA) tabanlı mekanizmalar gibi kimyasal değişikliklerden oluşmaktadır (Gibney ve Nolan, 2010; Talbert ve Henikoff, 2017; Tessarz ve Kouzarides, 2014; Villagra ve Frías-Lasserre, 2020). Organizmaların gelişimi, davranışsal değişiklikler, hücresel farklılaşma, çevresel adaptasyon ve hastalıkların oluşumu gibi birçok biyolojik süreçte epigenetik mekanizmalar görev almaktadır (Roth, 2013; Cunliffe, 2015). Epigenetik değişiklikler aynı zamanda çok hücreli organizmalarda hücreler arası etkileşim ve gelişim sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin embriyonik gelişim sırasında, hücrelerin farklılaşmasının düzenlenmesini ve hücre tipi özgüllüğünün korunmasını düzenlerler (Okwaro ve Korb, 2023; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020). Öte yandan bir hücre çeşitli çevresel faktörlerle (çevresel stres, beslenme, yaşlanma, maruz kalınan toksik bileşenler vs.) etkileşime girebilmektedir. Bu durum genlerin ifade edilme seviyelerini değiştirebilmektedir ve bu düzenlemeler epigenetik modifikasyonlar aracılığı ile gerçekleşmektedir (Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020; Roth, 2013; Cunliffe, 2015; Villagra ve Frías-Lasserre, 2020). Bununla birlikte epigenetik gelecekteki hastalıkların yeni moleküler biyobelirteçlerini belirleme potansiyeline sahip olması nedeniyle hastalıkların tedavisi ve önlenmesi ile ilgili yeni stratejiler geliştirme açısından da oldukça önemli bir alanı teşkil etmektedir (Voyias ve diğ., 2016).

Hayvan yaşam formları arasında böcekler, tür içi ve türler arası olarak ifade edilen ilgi uyandırıcı fenotipik çeşitlilikleri nedeniyle bilim insanlarının her zaman dikkatini çekmiştir. Dünya üzerindeki en büyük çok hücreli organizma grubu olan böcekler; bitkilerle birlikte karasal ekosistem biyokütlesinin büyük bir bölümünü oluştururlar (Talbert ve Henikoff, 2017; Villagra ve Frías-Lasserre, 2020; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020). Model organizma olarak seçilen böcekler, epigenetik mekanizmaların anlaşılması için kullanılan önemli kaynakları oluşturabilmektedir. Bal arısı zararlısı ve yaban arıları için konak görevi olan büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), bilimsel çalışmalar ve son yıllarda epigenetik araştırmalar için

model organizma özelliğinde önemli bir türdür (Mukherjee ve diğ., 2015; Mukherjee ve diğ., 2019; Özbek ve diğ., 2020). Böcekler çevresel değişikliklere hızla adapte olabilen organizmalar olduğu için epigenetik değişiklikler bu adaptasyon süreçlerinde önemli bir rol oynayabilmektedir. Bu durum böceklerde epigenetik mekanizmaların incelenmesinin önemini ortaya koymaktadır. *G. mellonella* ve benzeri böcek türlerinde yapılan epigenetik araştırmalar evrimsel, davranışsal, immünolojik, çevresel ve gelişimsel perspektiflerden birçok önemli bilgi sağlayabilmektedir (Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020; Villagra ve Frías-Lasserre, 2020).

Epigenetik mekanizmaların kontrolündeki en önemli kilit oyuncu, bir genin kromatin yapısını ve transkripsiyonel aktivitesini tanımlayan DNA metilasyonudur (Nakao, 2001). DNA metilasyonu istisnalar olsa da böcek türleri arasında yaygındır. Örneğin, *Drosophila melanogaster* gibi Diptera’lerde (sinekler ve sivrisinekler) genomun sadece %1’inin metillendiği bildirilmiştir (Takayama ve diğ., 2014). Bu metilasyon genellikle sitozin-adenin ve sitozin-timin dupletleri bakımından zengin ancak guanin bakımından yetersiz olan spesifik 5 baz çifti dizi motiflerinde meydana gelir. Karıncalar, arılar, eşek arıları, testere sinekleri, hamamböcekleri ve termitler dahil olmak üzere diğer böcek türlerinde, 5-metilsitozin muhtemelen epigenetik DNA modifikasyonunun en yaygın şekli olarak belirtilmiştir (Bewick ve diğ., 2017). Özbek ve diğerleri (2020), *G. mellonella*’nın pupal formunda 5-metilsitozin modifikasyonunun %3 olduğunu bildirmişlerdir. Böceklerde CpG metilasyonu insanlardan çok daha düşüktür ve öncelikle ekzonlarda yoğunlaşma eğilimindedir (Glastad ve diğ., 2011). Örneğin, bal arısı genomundaki 10 milyon CpG dinükleotitlerinin sadece 70.000’inin (%0,7) metillenmiş olduğu tespit edilmiştir (Lyko ve Maleszka, 2011). Ökaryotik genomlardaki metillenmiş sitozinlerin yüzdesi böceklerde %0-3, memelilerde ve kuşlarda %5, balıklarda ve amfibilerde %10 ile bazı bitkilerde %30’dan fazladır (Field ve diğ., 2004). Böcekler arasında farklılık gösteren DNA metilasyon seviyelerinin anlaşılması ve tanımlanması önemlidir. Model organizma *G. mellonella* ile gerçekleştirilecek araştırmalar epigenetik mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına ve tanımlanmasına katkı sağlayacaktır.

Bağışıklık sistemi canlıların adaptasyonuna katkı sağlayan, vücudu enfeksiyonlara ve hastalıklara karşı koruyan karmaşık bir sistemden oluşmaktadır (Medzhitov, 2007).

Böceklerin immün sistemi hem hücresel hem de hümorale bağışık tepkilerinden meydana gelmektedir (Kaya ve diğ., 2021). Hücresel savunma fagositoz, enkapsülasyon ve nodülasyon gibi direkt olarak hemositler tarafından yönetilen immün cevabı ifade etmektedir (Uçkan ve diğ., 2010; Kim ve diğ., 2017; Hong ve diğ., 2018). Hümorale savunma ise birçok antimikrobiyal peptit (AMP), pıhtılaşma ve fenol oksidaz (PO) yolağı gibi proteolitik kaskadlar sonucunda oluşan ürünleri kapsamaktadır (Tsakas ve Marmaras, 2010). Bu ürünler, patojenlere karşı doğrudan etkileşimde bulunabilir ve onları etkisiz hale getirebilir (Tsakas ve Marmaras, 2010; Sheehan ve diğ., 2018; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020).

Böceklerde bağışıklık sisteminin iyi tanımlanması ve tüm mekanizmalarının iyi bilinmesi bilim dünyası ve uygulamalı alanlarda büyük bir öneme sahiptir. Örneğin tarımda zararlı türlerle mücadele, biyolojik kontrol, sürdürülebilir tarım, evrim, adaptasyon, zoonotik hastalıkların anlaşılması, yeni ilaç gelişimine katkı, enfeksiyon, kanser, otoimmün hastalıkların teşhisi ve tedavisi, aşı geliştirme, immünolojik ve yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gibi (Barillas-Mury ve diğ., 2000; Beckage, 2008; Wang ve diğ., 2014; Brubaker ve diğ., 2015; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020). Ayrıca Covid-19 pandemisi, bağışıklık sistemine odaklanmanın ve pandemi yönetiminde bağışıklık sistemi araştırmalarının temel bir öneme sahip olduğunu vurgulamıştır. Böceklerde bağışıklık sisteminin anlaşılmasının, tarım, sağlık, biyoloji, ekoloji ve tıp gibi çeşitli alanlarda önemli uygulamalara yol açabileceğı ve daha etkili stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayabileceğı belirtilmektedir.

Canlıların epigenetik süreçler ve bağışıklık sistemi bakteriler, virüsler, mantarlar, patojenler ve çeşitli ksenobiyotikler (antibiyotikler, antidepresan gibi ilaçlar; organik çözücüler, plastik ve metal üretiminde kullanılan malzemeler gibi kimyasallar; pestisitler; endüstriyel atıklar, egzoz dumanları gibi hava kirliliğı maddeleri vs.) tarafından etkilenmektedir (Grova ve diğ., 2019). Ksenobiyotikler arasında yer alan nanomalzeme ve nanopartiküllerin (NP'ler) üretimi son zamanlarda katlanarak artmıştır ve bu malzemeleri içeren birçok ürün boyutları ve morfolojik özelliklerinden dolayı artık biyoloji, kimya, tıp, gıda bilimi, kozmetik, enerji sistemleri, endüstri ve eczacılık gibi çeşitli alanlarda kullanımı yaygınlaşmıştır (Huang ve diğ., 2007; Yang ve diğ., 2015; Murugan ve diğ., 2017; Duhan ve diğ., 2017; Benelli, 2018). Yeni teknolojilerde

kullanılmalarına rağmen NP'lerin sağlık ve evre üzerindeki epigenetik ve immünolojik etkileri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

Dünya Sağlık rgt'nün araştırmasına göre, her yıl ortalama 3,5 milyon insanın havadaki antropojenik NP'ler nedeniyle hayatını kaybettiği ve bu durumun önemli bir ekolojik tehlike oluşturduğu ifade edilmiştir (Silva ve diğ., 2020). Bu NP'ler solunum, sindirim veya dermal cilt bariyerlerine nüfuz ederek canlının dolaşım ve lenfatik gibi birçok sistemlerine girmektedir (Hashempour ve diğ., 2019). Bu sistemlerde birikimleri sonucu hücresel stres tepkileri değiştirerek organel otofajisi ve apoptozu tetikleyebilen sinyalleşme yollarını etkin hale getirebildiği iddia edilmektedir (Arul Prakash ve diğ., 2011; Cameron ve diğ., 2018; Alaraby ve diğ., 2019; Poon ve Patel, 2020). Bununla birlikte NP'lerin insan sağlığı ve çevresel toksik etkileri hakkındaki bilgi eksikliği (Peralta-Videa ve diğ. 2011; Rajput ve diğ., 2018) NP'lerin organizma üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Metal oksit ve plastik NP'ler nanoteknoloji ve malzeme bilimi alanlarında önemli bir yere sahiptirler. Bu NP'lerin endüstriyel uygulamaları bu alanlarda sürekli olarak yapılan araştırma ve geliştirmelerle genişlemektedir. Metal oksit nanoparçacıklar önemli endüstriyel malzemelerden biridir ve yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Horie ve Fujita, 2011; Tuncsoy ve Mese, 2021; Demirtürk ve diğ., 2023). Bunların en önemlileri kurşun, civa, alüminyum, arsenik, nikel gibi metallerdir. Alüminyum yer kabuğunda en çok yer alan üçüncü metalik elementtir. Alüminyum, alüminyum oksit NP (Al_2O_3 NP) şeklinde daha kararlı bir yapıya sahiptir (Chen ve diğ., 2008a; Poborilova ve diğ., 2013). Doğada birçok metal, oksitler ve sülfidler şeklinde bulunmaktadır (Egorova ve Ananikov, 2017). Alüminyum havada doğal bir oksit tabakası çekerek kendiliğinden oksitlenen bir prooksidandır. Metal NP'ler boyutlarına, yüzey morfolojilerine ve belirli proteinler veya lipidlerle etkileşim olasılığına bağlı olarak çeşitli yolları kullanarak hücreye girebilirler (Egorova ve Ananikov, 2017; Handy ve diğ., 2008). Ayrıca hidrofobik özellikleri ve küçük boyutları nedeniyle endositozla alınarak (Egorova ve Ananikov, 2017), hücre içerisinde NP yüzeyinin oksidasyonuna, indirgenmesine veya çözünmesine neden olabilirler. Oluşan kimyasal modifikasyonlar ve metal iyonları serbest radikallerin üretimini kolaylaştırabilir veya başka toksik etkiler yaratabilir (Egorova ve Ananikov, 2017). Alüminyumun toksisitesi

nispeten araştırılmış ve tartışılmış olmasına rağmen, Al₂O₃ NP'lerin toksisitesi akut uygulamalarla sınırlı kalmıştır (Poborilova ve diğ., 2013).

Evrensel plastik üretiminin artması son yıllarda kirlilik sorunu oluşturmaktadır. Plastikün bozunma süreci yavaş olduğu için her yıl büyük miktarlarda plastik atık doğal olarak çevreye girmekte ve birikmektedir (Kelpsiene ve diğ., 2022). Bu atıklar özellikle deniz ve okyanus kirliliğinin %70-80'ini oluşturmakta ve her yıl 8 milyon tonu denize taşınmaktadır (Waring ve diğ., 2018). Plastik endüstrisinde yılda birkaç milyon ton kadar üretilen polistiren (PS), en fazla kullanılan sentetik polimerlerdendir (Kik ve diğ., 2020). Bu polimer genellikle kozmetik ürünler, ilaçlar, boyalar, ısı yalıtımı, otomotiv sanayii, ayrıca tıbbi ve elektronik cihazlar olmak üzere birçok kullanım alanına sahiptir (Sarker ve diğ., 2012; Loos ve diğ., 2014; Kik ve diğ., 2020). Nano PS'ler doğaya atık şeklinde bırakılan PS plastiklerinin çevresel faktörlerle boyutlarının küçülmesi sonucu oluşabilmektedir (Koelmans ve diğ., 2015; Hernandez ve diğ., 2017) veya doğrudan endüstriyel üretim süreçlerinde doğaya serbest bırakılabilmektedirler (Paul ve diğ., 2020). Daha küçük nano yapıların doku ve organlara girişi daha kolaydır (Mattsson ve diğ., 2015). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada plastik türevli PS NP'lerin çeşitli yollarla organizmalara giriş yapabileceği belirtilmiştir (Kik ve diğ., 2020). Bu nedenle birçok yolla canlı sistemine girebilen PS NP'ler nanotoksositeye neden olabilmektedir (Paul ve diğ., 2020). Genellikle küçük boyutlardaki PS NP'lerin (20 nm) sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Fröhlich ve diğ., 2009; Fröhlich, 2012). Ayrıca, PS NP'lerin oksidatif DNA hasarının, apoptoz veya kalıcı büyüme durması gibi yanıtları indükleyebileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Wang ve diğ., 2013; Bexiga ve diğ., 2011; Marques-Santos ve diğ., 2018; Anguissola ve diğ., 2014; Koprinarova ve diğ., 2018). Bununla birlikte PS NP'ler makromoleküllere bağlanarak hücre metabolizmasını da etkileyebilirler (Frohlich, 2013).

NP'lerin insan sağlığı ve çevresel toksik etkileri hakkındaki bilgi eksikliği nanotoksositeyi ilgi odağı haline getirmektedir (Peralta-Video ve diğ. 2011; Rajput ve diğ., 2018). Aynı zamanda son yıllarda nanoteknoloji ve immünoloji gibi kapsamlı araştırma alanları ortak noktada birleşmektedir (Italiani ve diğ., 2020). Bu nano ölçekli malzemeler ve biyolojik sistemler arasındaki etkileşim ve bunlarla ilişkili tehlikeler henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Barbato ve diğ., 2020). Nanoparçacıklar ve

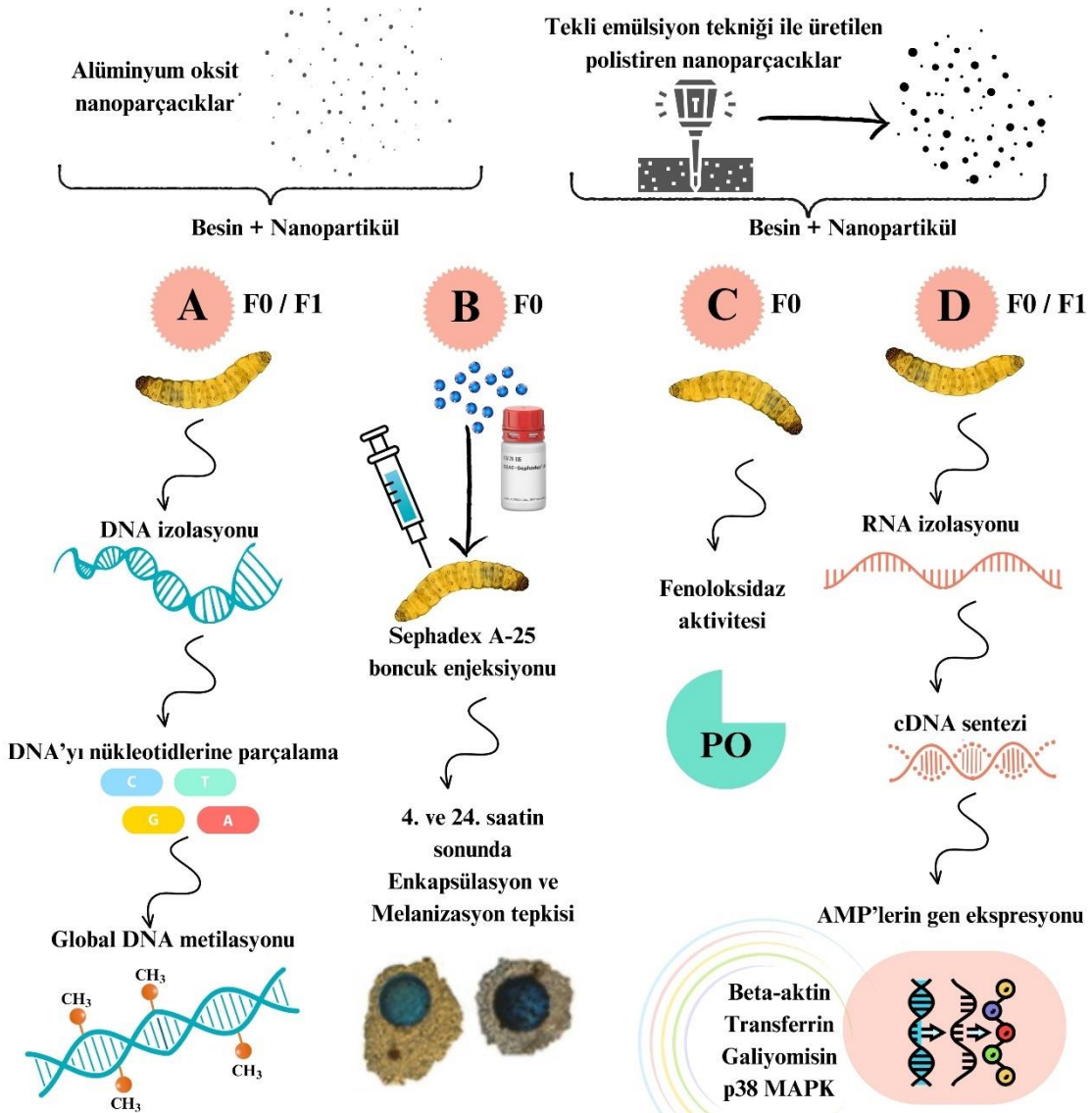
doğuştan gelen bağışıklık sistemi üzerine etkileri hakkındaki bilgilerin çoğalması son derece önemlidir (Italiani ve diğ., 2020).

Geniş kapsamlı kullanım alanına sahip Al_2O_3 metali ve PS polimerinin nano boyutlarda çeşitli nedenlerle çevreye salımı tüm ekosistemi ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu partiküllerin hücre membranları boyunca taşınarak epigenetik mekanizmaları değiştirebilmesi ve immünolojik değişikliklere neden olabilmesi toksikolojik bir endişe oluşturmaktadır. Öte yandan metal oksit NP'lerin toksikolojik etkileri ve plastik NP'lerin çevresel etkileri üzerine yapılan çalışmalar, bu malzemelerin güvenli kullanımı ve etkilerinin anlaşılması açısından da önemlidir.

Günümüzde NP'ler ve canlı organizmalar arasındaki ilişkileri anlamak ve ortaya koymak oldukça kritik öneme sahiptir. Nanoparçacıkların toksisitesinin değerlendirildiği verilerin büyük bir çoğunluğu *in vitro* analizler sonucu elde edilmiştir. Pek çok özelliği sebebiyle memeli hayvan modellerinden önce *in vivo* böcek modellerin kullanılması son derece önemlidir (Demirtürk ve diğ., 2023). Bununla birlikte *G. mellonella*'da epigenetik modifikasyonları ve immün sistemi etkileyebilecek bütün faktörlerin değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Büyük balmumu güvesi *G. mellonella* larvaları, NP'lerin kolay uygulanması ve insan vücut ısısında yaşayabilmesi sebebiyle *in vivo* model olarak kullanımının önemi artmaktadır (Moya-Anderico ve diğ., 2021; Demirtürk ve diğ., 2023). *G. mellonella* larvalarının memeli organizmalara göre üretim maliyetinin düşük olması, hızlı üretimi ve etik olarak daha kabul edilebilir olması gibi birçok özelliğinden dolayı deneylerde kullanılması daha fazla avantaj sağlamaktadır (Wojda, 2017; Kaya, 2020). Aynı zamanda NP'lerin gıdalara eklenmesi ve deri yoluyla maruz kalma olasılığı deneyler için uygun bir model organizma olarak nitelendirilmesini sağlamaktadır. Bu sebeple immünolojik çalışmalarda bu tip omurgasız model organizmaların tercih edilmesi yararlı olacaktır. Bununla birlikte bu organizma nesilden nesle epigenetik aktarımın ve bağışıklık sistemindeki etkileşimlerin belirlenmesi açısından da önemlidir.

Tüm bunların ışığında çalışmamızda NP'lerin boyut ve yüzey yükü gibi özellikleri karakterize edildi. Daha sonra Al_2O_3 ve PS NP'leri ayrı ayrı sindirim kanalı yoluyla verilerek *G. mellonella*'nın global DNA metilasyonu ve bağışıklık sistemi üzerine etkileri ilk kez karşılaştırmalı ve *in vivo* olarak incelendi (Şekil 1.1). Bu amaçla Al_2O_3

NP'ler üretici firmadan hazır olarak temin edildi. Farklı işlemler yapılarak ve analiz optimize edilerek tekli emülsiyon yöntemi ile PS NP'lerin üretimi gerçekleştirildi. Ardından bu NP'ler larval gelişim süresince *G. mellonella* larvalarına diyet ile uygulandı ve lethal konsantrasyonları (LC₅₀) belirlenerek deneysel dozlara karar verildi. Epigenetik modifikasyonlar arasında en önemli yere sahip olan global DNA metilasyonu ve bağışıklık sisteminde etkili belirlenen gen ekspresyon analizleri için ayrıca ikinci nesil oluşturuldu. İkinci nesle kadar yetiştirilen larvalarda herhangi bir NP uygulaması yapılmadı.



Şekil 1.1. Çalışmada uygulanan yöntemlerin genel özeti. A) Birinci ve ikinci nesil larvalarda global DNA metilasyonu analizleri, B) Birinci nesil larvalarda enkapsülasyon ve melanizasyon tepkileri, C) Birinci nesil larvalarda fenol oksidaz aktivitesi, D) Birinci ve ikinci nesil larvalarda AMP'lerin gen ekspresyon analizleri yapıldı. Nanoparçacık

solüsyonları ayrı ayrı larvaların besin içeriklerine eklendi ve bu besinle beslenen deney gruplarındaki tüm larvalar ile analizler gerçekleştirildi. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu F0: Birinci nesil, F1: İkinci nesil, PO: Fenol oksidaz

Global DNA metilasyonu için öncelikle birinci (F0) ve ikinci (F1) nesil larvalardan DNA izolatları elde edildi. Daha sonra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile global DNA metilasyon seviyeleri tüm deney gruplarında belirlendi ve sonuçlar değerlendirildi (Şekil 1.1.A). Hücrel bağışıklık yanıtları arasındaki enkasülasyon analizleri; hümorel bağışıklık yanıtları arasındaki melanizasyon (Şekil 1.1.B) ve fenol oksidaz enzim aktivitesi (Şekil 1.1.C) analizleri gerçekleştirildi. Fenol oksidaz aktivitesinin hesaplamaları için ayrıca toplam protein analizi yapıldı. Bununla birlikte Al_2O_3 ve PS NP'lerin böcek antimikrobiyal peptit (AMP)'leri arasında yer alan transferrin, galiyomisin ve p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (p38 MAPK) gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler incelendi (Şekil 1.1.D). β -aktin ise cDNA miktar ölçümü için kontrol olarak seçildi, β -aktin gibi housekeeping genler larvanın bağışıklık durumundan bağımsız olarak transkribe edilmektedir ve kontrol genleri olarak kullanılmaktadır. AMP genlerinin ekspresyon analizleri de ebeveyn (F0) ve yavru (F1) nesil olmak üzere gerçekleştirildi. Yapılan tüm analizlerin özeti şematik olarak Şekil 1.1'de verildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenez (Yunanca *epi*: üzerinde ve *genesis*: nesil) kavramını ilk olarak Aristoteles kullanmıştır. Aristoteles bu terimi M.Ö. 350 civarında gelişim süresince olgun bir organizmanın oluşumuna yol açan adımları açıklamak ve kendiliğinden oluşum fikrine karşı çıkmak için kullanmıştır. Kromatin ve kromozomların keşfiyle genetik yapılarda bulunan gelişimsel ve genetik programların varlığı gösterilmeye odaklanılmıştır (Felsenfeld, 2014; Villagra ve Frías-Lasserre, 2020). Bu doğrultuda ilk olarak *Drosophila melanogaster* kromozomlarının incelenmesi ve fenotipik ifadeyle bağlantıları temel alınmıştır (Morgan, 1911; Sturtevant, 1913). Daha sonra Waddington, 20. yüzyılda, bir organizmanın gelişimi için gen etkileşim ağlarının gerekli olması gerektiğini öne sürmüş ve “epigenetik” fikrini önermiştir (Jablonka ve Lamb, 2002). Epigenetik olarak ifade edilen fikir genler ve çeşitli çevresel etkiler arasındaki karmaşık etkileşim olarak şekillendirilmiştir (Waddington, 1959; Baedke, 2013). Waddington, genetik ile hücre biyolojisi, sitoloji, embriyoloji, davranış ve evrim gibi biyolojinin diğer alanları arasındaki dinamik etkileşimin farkındaydı (Slack, 2002). Epigenetik fikri sadece genetik ve fenotipik varyasyonun nasıl birleşebileceğini değil, aynı zamanda bu birleşmenin gerçekleşmediği durumları da göz önüne alarak orijinal bir katkı sunmuştur (Jablonka ve Lamb, 2002; Villagra ve Frías-Lasserre, 2020).

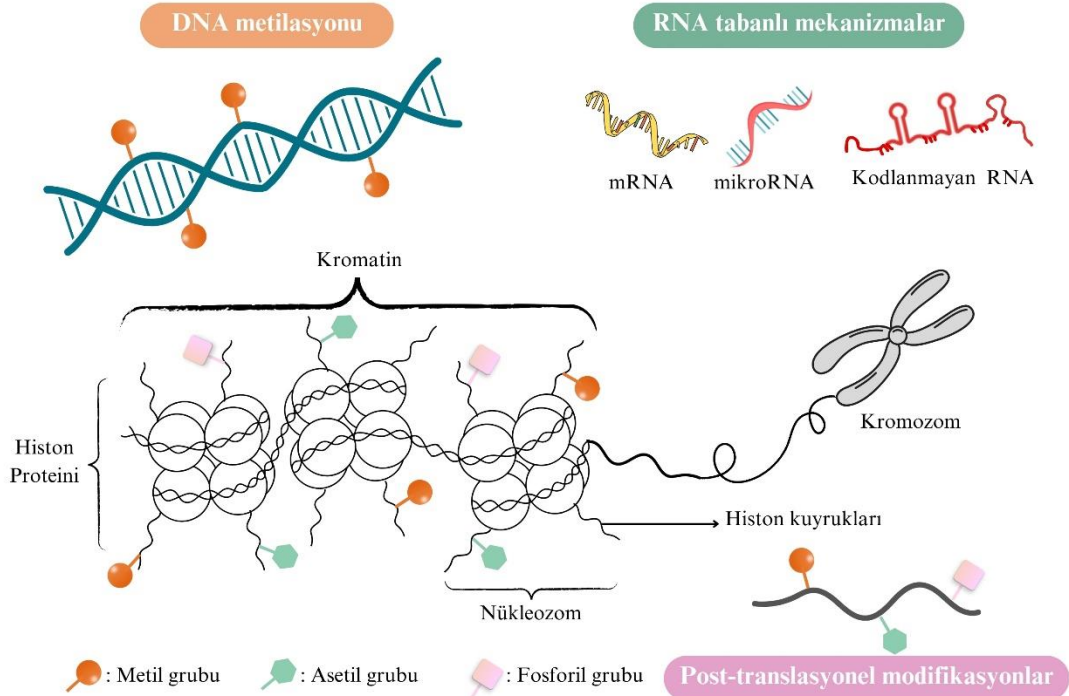
Waddington epigenetiği “fenotipi oluşturan genler ve gen ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen biyoloji dalı” olarak tanımlamıştır (Waddington, 2012). Buna göre genler ve çevre arasında bir aracı olarak “epigenom” (yani genom üzerindeki işaretler) kavramı ortaya çıkmıştır (Waddington, 2012; Jablonka ve Lamb, 2002). Gelişimsel farklılaşma yoluyla, farklı hücre tipleri çeşitli epigenomlar sergiler. Bu nedenle epigenomlar günümüzde tüm genlerin genom çapında epigenetik modifikasyon seviyelerinin haritalanmasını sağlayan DNA ve kromozom işaretlerinin bir koleksiyonu olarak kabul edilmektedir (Villagra ve Frías-Lasserre, 2020). Buna ek olarak bu mekanizmaların keşfi ile transjenerasyonel epigenetik kalıtım fikri de daha fazla önem kazanmaya başlamıştır. Yani çevresel veya farklı etmenler sonucu kalıtılabilir bir fenotipin ortaya çıkması düşüncesidir (Skinner ve diğ., 2010). Waddington, *D. melanogaster* üzerinde yaptığı çalışmada edinilmiş karakterlerin kalıtımını inceleyerek,

çevresel etkilerin neden olduğu bazı özelliklerin “genetik asimilasyon” süreciyle nesiller boyunca nasıl korunduğunu açıklamaya çalışmıştır. Ancak o dönemde moleküler tekniklerin bulunmaması nedeniyle bu değişikliklerin genetik mi yoksa epigenetik mi olduğunu kanıtlanamamıştır (Waddington, 1959). Yakın zamanda Waddington’un genetik asimilasyon hipotezinin doğru olduğunu ve epigenetik değişikliklerin genellikle nesilden nesile aktarıldığı gösterilmiştir (Gapp ve diğ., 2014). Farklılaşmış hücrelerin epigenomundaki değişikliklerin, mitotik bölünme sırasında yavru hücrelere aktarıldığı belirtilmiştir (West-Eberhard, 2005; Villagra ve Frías-Lasserre, 2020).

Epigenetik mekanizmalar DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan gen ekspresyonundaki mitotik kalıtsal değişiklikleri kapsamaktadır (Waterland ve Michels, 2007). DNA metilasyonu-asetilasyonu, post-translasyonel modifikasyonlar ve kodlanmayan RNA’ların işlevleri gibi süreçler epigenetik mekanizmaları oluşturmaktadır (Şekil 2.1). Epigenetik mekanizmalarda DNA metiltransferazlar (DNMT’ler), metil-CpG bağlanma proteinleri, histon modifikasyon enzimleri ve adenosin trifosfat (ATP)-bağımlı kromatin düzenleme kompleksleri görev almaktadır (Li, 2002; Nikolova ve diğ., 2018). Epigenetik mekanizmalar, erken embriyogenez ve gametogenez sırasında genomun yeniden programlanması, hücre farklılaşması ve kararlı bir soyun korunması gibi tüm biyolojik süreçleri düzenler (Delcuve ve diğ., 2009). Spesifik bir genin transkripsiyonu veya baskılanması DNA-transkripsiyon faktörleri kompleksinin konformasyonel yapısına, transkripsiyon faktörleri ve ilişkili proteinlerin belirli promotör bölgelerine bağlanmasına bağlıdır (Kouzarides, 2007; Glastad ve diğ., 2019). Histon proteinlerinin epigenetik modifikasyonları gerçekleşirken, en az sekiz farklı enzim aracılı modifikasyonlar olduğu bulunmuştur. Bu modifikasyonlar; asetilasyon, lizin metilasyonu, arjinin metilasyonu, fosforilasyon, ubikinitasyon, sumoylasyon, deaminasyon ve prolin izoşimerizasyonudur. Bu modifikasyonlardan en çok araştırılan ve bilinenleri ise metilasyon, asetilasyon ve fosforilasyondur (Şekil 2.1; Foulks ve diğ., 2012; Shanmugam ve diğ., 2018).

Epigenetik izler mitotik olarak kalıtsal olduğu için çevresel etmenlerden etkilenebilme özelliğindedir (Waterland ve Michels, 2007; Candler ve diğ., 2019). Özellikle kanser ve fetal büyüme bozuklukları olan çeşitli hastalıkların etiyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Esteller, 2008; Joss-Moore ve diğ., 2015). Bu nedenle epigenetik

gelecekte ortaya çıkabilecek hastalıkların potansiyel belirteçlerini üretme yeteneğine de sahip olabilmektedir (Yamada ve Chong, 2017; Fall ve Kumaran, 2019). Özellikle çevresel kimyasallara yanıt olarak, epigenetik süreçler sonucu oluşan modifikasyonların hücreSEL davranışı ve hastalık riskini ne ölçüde değiştirebileceği merak konusu olmuştur (Skinner ve diğ., 2010). Bu kimyasallara sadece maruz kalan bireylerde değil, aynı zamanda birbirini takip eden nesillerde sonraki jenerasyona bir fenotipi aktarabilir veya hastalık durumu oluşturabilir. Bu süreç bir organizmanın üreme hücrelerinde gerçekleşen modifikasyonlar ile gerçekleşebilmektedir (Skinner ve diğ., 2010; Skinner ve diğ., 2015). *In vitro* hayvan ve insan araştırmaları, metaller (kadmiyum, arsenik, nikel, krom vs.) peroksizom proliferatörleri (trikloroetilen, dikloroasetik asit ve trikloroasetik asit), hava kirleticileri (partikül maddeler, siyah karbon ve benzen) ve endokrin bozucu / üreme toksik maddeleri (dietilstilbestrol, bisfenol A, kalıcı organik kirleticiler ve dioksin) gibi çeşitli çevresel zararlı bileşenlerin epigenetik mekanizmaları değiştirebildiğini ortaya koymaktadır (Christensen ve Marsit, 2011; Szyf, 2011; Cheng ve diğ., 2012).



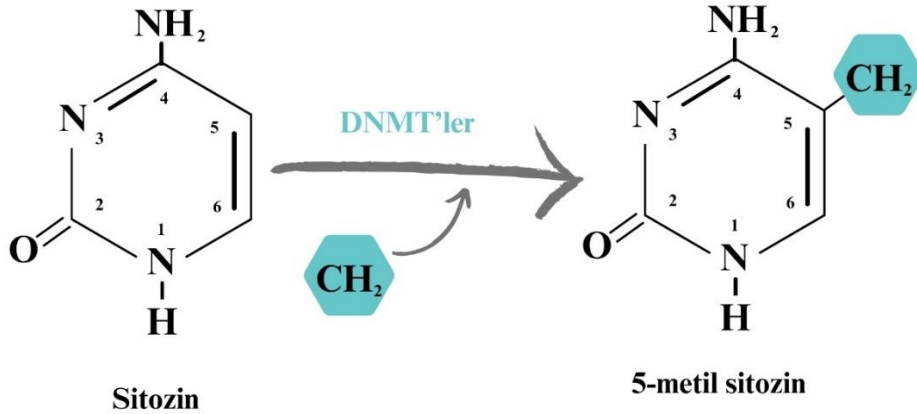
Şekil 2.1. Epigenetik modifikasyonlar. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

Memeli modeller arasında transkripsiyonel yeniden düzenlenme ile epigenetik kalıtım, genellikle fareler kullanılarak araştırılabilir. Ancak bu araştırmalar çok fazla hayvanın bakılmasını, izlenmesini ve invaziv testler yapılmasını gerektirir. Bu nedenle memeli modeller ile epigenetik araştırmalar yapılması hem ekonomik hem de etik endişelere neden olmaktadır. Memeli hücre kültürleri de epigenetik kalıtımın araştırılmasında bir seçenek oluşturabilir. Ancak böcekler epigenetik modifikasyonlar ve jenerasyonlar arası aktarım araştırmaları için çok uygun canlılardır (Lötsch ve diğ., 2013; Mukherjee ve diğ., 2015). Böceklerin gelişimi, morfolojisi, fizyolojisi, davranışı ve ekolojisi; araştırmacıları kalıtım ve evrimsel biyoloji ile ilgili geniş soruları ele almaya yönlendirmiştir (Footitt ve Adler, 2009). Kısa üretim süreleri ve morfolojik olarak farklı gelişim evreleri (yumurta, larva, pup ve ergin) sayesinde, gelişimsel ilerlemeyi etkileyen faktörler objektif olarak ölçülebilir (Grünwald ve diğ., 2013; Mukherjee ve diğ., 2015). *G. mellonella* modelinin ayrıca epigenetik mekanizmaları araştırmak için kullanımı, kuşaklar boyunca hastalık etiyolojisi ve konak patojen etkileşimlerinin sonuçları genetik analizlerin ötesine genişletmektedir (Srinivasan ve Brisson, 2012; Mukherjee ve diğ., 2015). Bu nedenle böcekler gelişim ve fenotipik değişkenlikle ilgili mekanizmaların ve kuşaklar arası etkilerin incelenmesi için her yerde bulunan model organizmalar olmuştur (Glastad ve diğ., 2019; Villagra ve Frías-Lasserre, 2020).

2.1.1. DNA Metilasyonu

Gen regülasyonu, davranışsal ve fenotipik plastisite için en önemli epigenetik düzenlemelerden biri DNA metilasyonudur (Roberts ve Gavery, 2012; Kader ve diğ., 2018). DNA metilasyonu genomdaki CpG dinükleotitlerindeki sitozinin primidin halkasının beşinci karbon atomuna bir metil grubu eklenmesi ile meydana gelir (Şekil 2.2; Nakao, 2001; Goll ve Bestor, 2005). Bu durum gen ekspresyonunun artması veya baskılanması ile sonuçlanmaktadır. Genomik DNA'nın metilasyonu memeli, bitki ve mantar türlerinde kapsamlı bir şekilde incelenen DNMT'ler olarak isimlendirilen korunmuş bir enzim ailesi tarafından katalize edilir (Goll ve Bestor, 2005). Hayvanlardaki DNA metilasyonu iki alt aileden oluşan nispeten iyi karakterize edilmiş bir DNMT ailesine dayanmaktadır (Şekil 2.2) (Schaefer ve Lyko, 2010; Lyko ve Maleszka, 2011; Kay ve diğ., 2018; Provataris ve diğ., 2018). Hayvanlarda DNA metiltransferaz 3 (DNMT3) ile sitozinin beşinci karbonuna metil grubu eklenerek DNA

metilasyonu gerçekleştirilir. DNA metilasyonunun yeni sentezlenen DNA zincirine aktarılmasını sağlamak için metil gruplarının replikasyon sonrası düzenlenmesinde DNMT1 rol oynar (Bewick ve diğ., 2017; Provataris ve diğ., 2018; Morandin ve diğ., 2019). Memelilerde ise DNMT'lerin beş adet izoformu vardır, DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L. Ancak sadece DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b genomik DNA'yı metiller (Foulks ve diğ., 2012; Dammann ve diğ., 2017). Metilasyon DNMT3a ve DNMT3b tarafından DNMT3L'nin de yardımı ile gerçekleştirilir (Jia ve diğ., 2007) ve erken embriyo, gelişim ve karsinogenez sırasında yeni metilasyon şekillerinin oluşturulmasında önemli rol oynarlar (Okano ve diğ., 1999). DNMT1'in fonksiyonu, DNA replikasyonu sırasında ana iplikteki metilasyon şeklini yeni ipliğe aktarmaktır. DNMT3a/3b'nin metilasyon şeklinin devam ettirilebilmesi için DNMT1'e yardımcı olduğu belirlenmiştir (Okano ve diğ., 1999; Rhee ve diğ., 2002; Liang ve diğ., 2002; Chen ve diğ., 2003). DNMT'lerin filogenetik analizleri sonucunda bu üç DNMT enziminin hepsinin hem omurgasızların hem de omurgalıların son ortak atalarında varlığı tespit edilmiştir (Lyko ve Maleszka, 2011; Glastad ve diğ., 2019).



Şekil 2.2. Sitozin pirimidin halkasının DNA metiltransferazlar ile 5-metil sitozine metillenme reaksiyonu. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

Böceklerin memelilere göre daha küçük ve ökromatik genomları bulunmaktadır. Bu nedenle DNA metilasyonunun genom çapında analizi daha kolay ve pratik olmaktadır (Boros, 2012; Mukherjee ve diğ., 2015). Şimdiye kadar omurgalılarda ve bitki sistemlerinde, DNA metilasyonu ile ilgili daha titiz fonksiyonel analizler yapılmıştır

(Nikolova ve diğ., 2018; Morandin ve diğ., 2019). Böceklerdeki DNA metilasyonunun fonksiyon ve mekanizmasının çalışılması nispeten yenidir ve tam olarak çözümlenememiştir. Böceklerde DNA metilasyonu, ilk olarak yaklaşık 30 yıl önce tanımlanmaya başlandı (Sarkar ve diğ., 1992; Suzuki ve Bird, 2008; Glastad ve diğ., 2014). Günümüzde ise pek çok böcekte metilasyon olduğu belirlenmiştir (Glastad ve diğ., 2011). DNA metilasyonunun gerçekleştiği genomik bölgeler, böcek taksonları arasında önemli derecede değişiklik göstermektedir. CpG dinükleotitleri özellikle holometabol böceklerde transkripsiyona uğrayan gen bölgelerinde bulunurlar. DNA metilasyonu öncelikle genlerin 5' bölgesinde bulunan ekzonlarda gerçekleşmektedir (Zemach ve diğ. 2010; Bonasio ve diğ., 2012; Provataris ve diğ., 2018). Gen aktivitelerini modüle edebilir veya nükleozom stabilitesi yoluyla gen fonksiyonunu etkileyebilir (Morandin ve diğ., 2019). Ayrıca DNA metilasyonunun model organizmaya ve deneysel analizlere bağlı olarak çok sayıda fonksiyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Field ve diğ., 2004).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları birbiriyle ilişkilidir. Birçok çalışmada DNA metilasyonunun histon modifikasyonları ile, histon modifikasyonlarının da DNA metilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Jackson ve diğ., 2002; Soppe ve diğ., 2002; Tariq ve diğ., 2003; Chuang ve Jones, 2007). Ökaryotlarda gen ekspresyonu, kromatin yapısını değiştiren ve DNA'nın transkripsiyon faktörlerine erişimini değiştiren histon proteinlerinin asetilasyonu, metilasyonu, fosforilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenir (Mukherjee ve diğ., 2012). Kromatin transkripsiyonel olarak aktif (ökromatin) veya inaktif (heterokromatin) bir durumda olabilir. Histon proteinlerindeki konformasyonel veya DNA'nın nükleozomlardaki histon proteinleri etrafına sarılması gibi değişiklikler, transkripsiyonel bazı genlerin promotör bölgesine ulaşmasını değiştirebilmektedir, bu da gen susturulmasına veya aktivasyonuna neden olabilmektedir (Hu ve diğ., 2017).

Özetle epigenetik mekanizmaları oluşturan DNA metilasyonu, böcek ontogenisi süresince genetik, davranışsal, fizyolojik ve çevresel düzenleyicilerle etkileşime girerek böcek fenotipini etkiler. Bu durum böceklerin abiyotik ve biyotik kaynaklardan kaynaklanan stres gibi farklı hareketleri kontrol etmesine ve tolere etmesine izin verir.

Aynı zamanda böcekler yapılarını, davranışlarını değiştirme ve hatta sonraki nesilleri etkileme yeteneği sağlar (Villagra ve Frías-Lasserre, 2020).

2.1.2. Post-Translasyonel Modifikasyonlar

Epigenetik mekanizmalar ökaryotlarda DNA'nın paketlenmesi ve düzenlenmesi ile görevli nükleoprotein topluluğu olan kromatindeki yapısal değişikliklerle ilgilidir. Kromatin histonlar olarak bilinen 8 bileşenli protein komplekslerinin (H2A, H2B, H3, H4 proteinleri ve bunların her birinin iki kopyası) etrafına sarılmış nükleozom adı verilen 146 baz biriminden oluşur (Müller ve Muir, 2015). H2A ve H2B histonlarının “kuyrukları” ile H3 ve H4 histonlarının aminoterminal uçları nükleozom çekirdeğinden çıkıntı yapar. Bu proteinlerin kuyrukları ve aminoterminal uçları epigenetik modifikasyonların hedefi olmaktadır (Bártová ve diğ., 2008). Genel olarak sitolojik özelliklerine göre kromatin ökromatin (transkripsiyonel olarak aktif) ve heterokromatin (transkripsiyonel olarak inaktif) şeklinde iki durumda bulunabilir. Heterokromatin tüm hücre döngüsü boyunca yoğunlaşmış şekilde farklılık gösterirken, ökromatin interfaz sırasında oldukça dağınık görünmektedir (Grewal ve Jia, 2007; Hu ve diğ., 2017). Kromatin transkripsiyon, DNA onarımı, replikasyon ve mayotik rekombinasyon gibi nükleer olayları düzenler (Swedlow ve Hirano, 2003). Böylece fenotip oluşumunun gelişimi ve ontogenisi üzerinde düzenlemeyi etkileyebilir (Yan ve diğ., 2014). Bunlar ATP'ye bağlı kromatin yeniden şekillendirme kompleksleri, histon varyantları, histon şaperonları ve histon post-translasyonel modifikasyonlarından oluşan, bağımsız olmayan ancak iş birliğine dayalı birkaç sürece bağlıdır (Talbert ve Henikoff, 2017; Tessarz ve Kouzarides, 2014; Villagra ve Frías-Lasserre, 2020). Post-translasyonel modifikasyonlar gen ifadesini düzenleyerek hem transkripsiyonel aktivasyona hem de gen baskılanmasına yol açmaktadır (Jenuwein ve Allis, 2001). Şimdiye kadar tanımlanan post-translasyonel modifikasyonlar arasında; histonların metilasyonu, asetilasyonu, fosforilasyonu, propiyonilasyonu, krotonilasyonu, sitrülilasyonu, butirilasyonu, glikozilasyonu, ubikitilasyonu, sumoyilasyonu, ADP-ribozilasyonuna ve prolin izomerizasyonu yer almaktadır (Villagra ve Frías-Lasserre, 2020; Foulks ve diğ., 2012; Shanmugam ve diğ., 2018). Bu değişiklikler kromatin yapısı ve şekli ile ilişkili histon dışı proteinleri de içeren diğer süreçlerle birlikte, kromatinin yeniden şekillenmesine yol açan başka unsurlar tarafından etkilenir (Suganuma ve Workman,

2011). Tüm bu düzenlemeler çok hücreli organizmaların birçok ilgili özelliğinin kontrolünde gelişimsel, fizyolojik, davranışsal gibi diğer düzenleyici sistemlerle iş birliği halindedir (Davie, 2004).

2.1.3. RNA Tabanlı Mekanizmalar

Ribonükleik asitler (RNA'lar) tersiyer yapılar oluşturarak, karmaşık bağlantı noktaları ve boşlukları sayesinde gen ifadesini kodlama, düzenleme ve değiştirme, aynı zamanda diğer RNA'larla ve farklı yapı ve rollere sahip moleküllerle etkileşime girebilmektedir (Holley ve diğ., 1965; Lilley, 2011). Böceklerdeki RNA tabanlı epigenetik modifikasyonlar hücre işleyişinden gelişimsel plastisiteye ve transjenerasyonel epigenetik kalıtıma kadar birçok önemli biyolojik süreç içerisinde yer almaktadır (Frías-Lasserre ve Villagra, 2017). Bu epigenetik modifikasyonlar uzun kodlanmayan RNA segmentleri (ncRNA'lar) olarak iki alt gruba ayrılmaktadır; 200 nükleotitten fazla olanlar ve 20-40 nükleotit arasında değişen kısa kodlamayan RNA'lar (Villagra ve Frías-Lasserre, 2020). Tanımlanan tüm epigenetik mekanizmalar birbirleriyle bağlantılıdır. Epigenetik mekanizmalar bir kontrol sistemi olarak fenotipik gelişim sırasında düzenleyici etkilerini baskılayarak ya da artırarak etkileşime girebilmektedir. DNA metilasyonu sırasında metilasyon işaretlerinin konumu hem ncRNA'lar hem de post-translasyonel modifikasyonlar ile kromatin değiştirici kompleksler tarafından etkilenebilmesi bu duruma örnek olarak verilebilir (Lyko ve Maleszka, 2011).

2.2. Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık sistemi, enfeksiyona karşı savunmada özelleşmiş rolleri olan hücreler ve moleküllerden oluşan bir organizasyondur (Delves ve Roitt, 2000). Böceklerde doğuştan gelen bağışıklık sistemi enfeksiyon, enflamasyon veya diğer hücresel stres elemanları patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından tanınmaktadır. Yabancı bileşenlerin patojenlerle ilişkili moleküler kalıplar (PAMP'lar) tarafından tanınması sonucu hücre yüzeyinde veya hücre içinde bulunan PRR'ler konağa enfeksiyonun varlığını bildirir (Mogensen, 2009). Adaptör moleküller, kinazlar ve transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere çok sayıda hücre içi sinyal yolağı aktive edilerek proinflamatuvar ve antimikrobiyal yanıtları uyarır. Uyarılan sinyal iletim yolları sitokinler, kemokinler, hücre adezyon molekülleri ve immünoresptörlerle gen

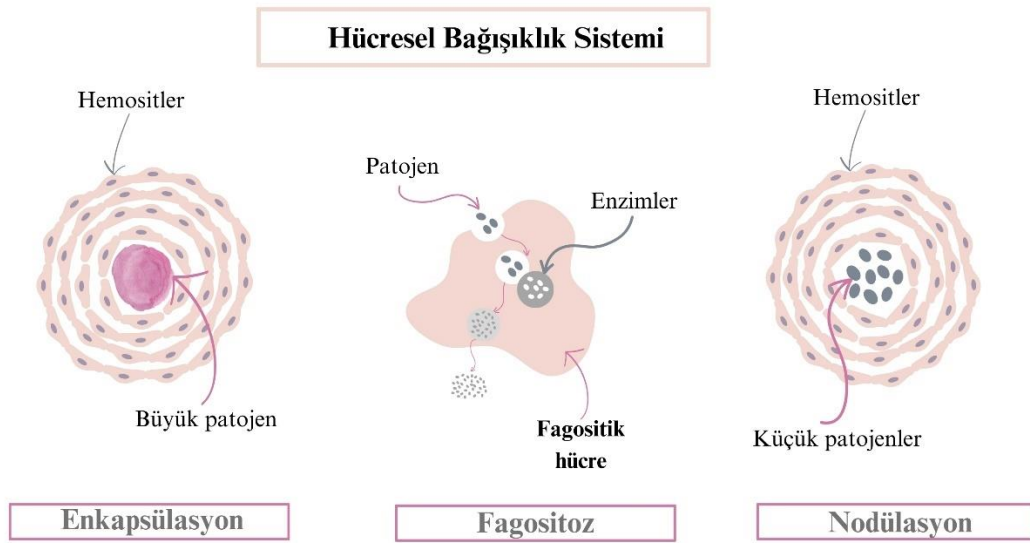
ekspresyonunu aktive eder. Tüm bunlar birlikte enfeksiyona karşı erken konak yanıtını düzenler (Mogensen, 2009; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020).

Böcekler antikor üretiminin olmaması, hücresel ve hüморal bağışıklıktan oluşan karmaşık doğuştan gelen bağışıklık sistemini barındırdığı için çok çeşitli bilimsel analizler için potansiyel bir aday haline gelmektedirler (Franco, 2013; Kaya ve diğ., 2021). Böcekler iyi gelişmiş doğuştan gelen bir immün yanıt sistemine sahiptir ancak genellikle memelilerin aksine adaptif bir bağışıklık sisteminden yoksun oldukları düşünülmektedir (Strand, 2008). Enkapsülasyon, fagositoz ve nodülasyon hücresel doğuştan gelen bağışıklık yanıtının bir parçasını oluşturur ve bu süreçler hemositler (böcek kan hücreleri) tarafından düzenlenir (Hoffmann, 2003; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020). Hüморal doğuştan gelen bağışıklık yanıtı ise melanin sentezi (melanizasyon), pıhtılaşma ve AMP'lerin üretiminden sorumludur. Bu süreçler çözünabilir plazma proteinleri ya da yağ doku (memeli karaciğeri eşdeğeri) tarafından gerçekleştirilir (Hoffmann, 2003; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020).

2.2.1. Böceklerde Hücresel Bağışıklık Yanıtı

Hücre aracılı savunma, doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından aktive edilen “hemositler” tarafından gerçekleştirilir. Hemositlerin rol oynadığı hücresel bağışıklık tepkileri enkapsülasyon, fagositoz ve nodülasyon gibi çeşitli süreçler ve yollardan oluşmaktadır (Şekil 2.3; Hong ve diğ., 2018; Kim ve diğ., 2017). Lepidoptera larvaları dört farklı hemosit türü içermektedir. Bunlar enkapsülasyonda rol oynayan plazmatositler, fagositozu uyaran granüositler, PO gibi melanizasyon kaskadına dahil olan enzimleri üreten önositoidler ve bağışıklık fonksiyonu belirsiz kalan siferül hücrelerdir (Lavine ve Strand, 2002; Hillyer, 2016; Laughton ve diğ., 2017; Kenmoku ve diğ., 2017). Lepidopterlerin hemolenfinde en çok bulunan hemositler granüositlerdir. Granüositler çok güçlü adhesif özellik sergiler ve organizmaya giren patojenler gibi yabancı maddelerin yüzeylerine simetrik olarak katmanlar şeklinde yapışarak yayılırlar. Bu şekilde fagositoz, enkapsülasyon ve nodülasyon gibi hücresel savunma mekanizmalarında yabancı maddelerin yok edilmesinde görev alırlar (Lavine ve Strand, 2002; Laughton ve diğ., 2017; Kenmoku ve diğ., 2017). Plazmatositlerin yüzeyleri granüositlerden daha geniştir, yabancı yüzeylerde asimetrik dağılırlar ve çok güçlü adhesif özellik sergilerler. Granüositler gibi plazmatositler de fagositoz,

enkapsülasyon ve nodülasyonda görev alırlar (Lavine ve Strand, 2002; Hillyer, 2016; Laughton ve diğ., 2017). Önositoidler Lepidopterlerin larval evresinde adhesif özellikte değildir. Siferül hücreleri PO kaskad bileşenlerini içerir ve kütikular komponentler için potansiyel kaynaklardır (Strand, 2008; Pereira ve diğ., 2018). Birçok Lepidopterde bulunan prohemositler ise ata (progenitor) hücre olarak bilinirler ve sonradan diğer hemositlere farklılaşırlar (Castillo ve diğ., 2006; Hillyer, 2016). Lepidopterlerin dolaşımında %1'den daha az oranda prohemosit bulunur (Beckage, 2008). Prohemositlerden farklılaşmış hemositler ilk olarak sesildirler, ancak organların iç yüzeylerine zayıf bir şekilde tutunurlar. İmmün sistem uyarıldığında dolaşıma hızlı bir şekilde geçerler ve hemolenfteki sayılarını arttıırırlar (Moita ve diğ., 2005; Castillo ve diğ., 2006). Hemositlerin varlığını devam ettirmesi, halihazırda var olan hücrelerin proliferasyonu ve hemositlerin salınması ile ilişkilidir (Lavine ve Strand, 2002; Strand, 2008; Pereira ve diğ., 2018). Hemositler ayrıca apoptotik cisimcikler, sentetik boncuklar gibi cansız partikülleri de tanırlar ve içlerine alırlar (Lavine ve Strand, 2002; Keehnen ve diğ., 2019).



Şekil 2.3. Böceklerde hücresel doğuştan gelen bağışıklık yanıtı. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

Enkapsülasyonda pek çok hemosit organizmaya giren protozoan, parazitoit ve nematodlar gibi daha büyük istilacıların etrafında toplanır. Bu istilacıların etrafında üst üste binen hemosit katmanlarından oluşan bir kapsülün oluştuğu çok hücreli bir

savunma mekanizmasıdır (Dubovskiy ve diğ., 2016; Pereira ve diğ., 2018). Lepidoptera'da enkapsülasyon oluşumunda plazmatositler son derece önemlidir. Bu hücreler yabancı hedeflerin tanınmasında ve enkapsülasyon tepkisini oluşturmada iş birliği içindedir. Enkapsülasyon sırasında katmanlar içinde ve etrafında melanin depolanır (Dubovskiy ve diğ., 2016; Pereira ve diğ., 2018; Vilmos ve Kurucz, 1998).

Bir hedef tanındığında, kapsül veya nodül oluşumu için dolaşımdaki hemositlerin adhesif olmayan hücrelerden hedefe ve birbirlerine bağlanabilen adhesif hücrelere dönüşmesi gerekmektedir (Baggiolini ve diğ., 1997). Memeli immünositlerinin yapışkan durumundaki değişiklikler sinyal molekülleri (sitokinler), hücre adhezyon molekülleri ve bunların ilgili reseptörleri tarafından düzenlenir (Baggiolini ve diğ., 1997). Lepidoptera'da ise granüler hücrelerin veya hümorale PRR'lerin yabancı bir yüzeye bağlanması plazmatositlerin adhesif özellik kazanmasına neden olmaktadır (Lavine ve Strand, 2002). En güçlü plazmatosit aktivatörünün, plazmatosit yayılma peptidi (PSP) adı verilen 23 amino asitli bir sitokin olduğu bildirilmiştir (Clark ve diğ., 1997). PSP'ler plazmatositlerin saniyeler içinde yabancı yüzeylere toplanmasına veya yapışmasına neden olur. PSP homologları lepidoptera'dan tanımlanmıştır ve bazı durumlarda bu homologların plazmatosit aktivatörleri olduğu da gösterilmiştir (Wang ve diğ., 1999; Strand ve diğ., 2000). PSP'ler diğer proteinlerle karşılaştırıldığında, PSP'nin çekirdek bölgesi ile insan epidermal büyüme faktörünün C-terminal alt alanına ve antikoagülan protein trombomodulinin beşinci alanına çok benzer bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (Lavine ve Strand, 2002). Hücre dışı sinyal moleküllerinin plazmatositlerin yapışkan durumunda değişikliğe neden olduğu reseptör integrinlerdir. Omurgalılarda ise dört ana reseptör ailesi hücre adezyon olaylarına aracılık eder: kadherinler, hücre adezyon molekülleri gibi immünoglobulinler, selektinler ve integrinler. Integrinlerin enkapsülasyon sırasında plazmatosit bağlanmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Wang ve diğ., 1999; Lavine ve Strand, 2002).

Enkapsülasyondan sonra kapsüllenmiş organizma neredeyse her zaman yok edilir. Bu hücresel tepki sonucu profenol oksidaz (proPO) kaskadı ile toksik kinon veya hidrokinon üretimi, reaktif oksijen-azot ara ürünleri ve antibakteriyel peptitler gibi çeşitli faktörlerin "öldürücü ajanlar" olarak görev aldığı öne sürülmektedir (Nappi ve diğ., 2000). Bununla birlikte böcek hemositlerinin kapsüllenmiş hedeflerin

öldürülmesinde bu faktörlerden herhangi birinin rolünü destekleyen çok az doğrudan deneysel kanıt vardır. Bununla birlikte melanizasyon reaksiyonları sırasında üretilen sitotoksik kinoid ara maddelerinin öldürücü ajanlar olarak hizmet edebileceği de önerilmiştir (Nappi ve diğ., 2000; Lavine ve Strand, 2002).

Fagositoz memelilerde olduğu şekilde böceklerde de doğuştan gelen hücresel bağışıklık tepkisi olarak kabul edilmektedir (Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020). Böceklerde fagositoz patojenik mikroorganizmaların ortadan kaldırılması, apoptotik hücrelerin atılması, doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin uyarılması gibi biyolojik süreçlerde yer alır ve evrimsel olarak iyi korunmuş bir immün cevaptır (Dubovskiy ve diğ., 2016; Kwon ve Smith, 2019; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020). Fagositik hemositler üzerinde tanımlanan hücre reseptörleri, memeli fagositik hücrelerinde bulunan reseptörlerle çarpıcı bir şekilde benzerlik göstermektedir. Örneğin böcek proteinleri Malvolio ve *Drosophila* süpürücü reseptör CI sırasıyla farelerde doğal dirençle ilişkili makrofaj protein-1 ve memelilerde A sınıfı makrofaj spesifik süpürücü reseptörleriyle homoloji göstermektedir (Rodrigues ve diğ., 1995; Pearson ve diğ., 1995).

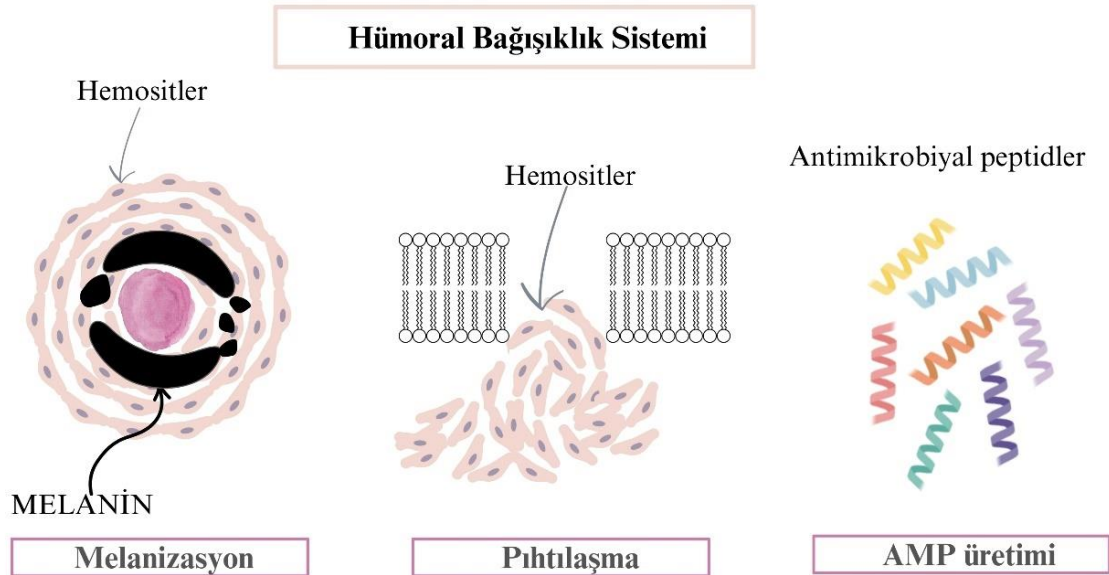
Memeli fagositlerinin fagozom içine veya hücre dışına salınan ve çeşitli mikroorganizmalar için toksik olan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerini (RNS) ürettiği iyi bilinmektedir (Nathan ve Hibbs, 1991). ROS veya RNS ayrıca birçok böceğin hemolenfinde ve/veya hemositlerinde de tespit edilmiştir (Lavine ve Strand, 2002). ROS ve RNS'nin etkilerinden bazıları, parazitler veya patojenler üzerindeki doğrudan sitotoksik etkilerinden ziyade, bağışıklıkla ilgili sinyal iletim yollarındaki rollerinden kaynaklanıyor olabileceğidir. Memelilerde hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROS ve nitrik oksit (NO) gibi RNS, nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'nin aktivasyonunu içeren sinyal iletim yollarında ikincil haberciler olarak işlev görür (Kaul ve Forman, 1996). Sinyal yollarının aktive olması sonucu çeşitli AMP ekspresyonları artar. Örneğin ekzojen H_2O_2 'nin dev ipekböceği *Hyalophora cecropia*'da antimikrobiyal peptit attasin ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Sun ve Faye, 1995; Lavine ve Strand, 2002). Böceklerde yağ dokusu genellikle AMP'lerin en önemli kaynağı olarak bilinse de bazı böceklerde hemositler de AMP'leri üretmektedir (Lavine ve Strand, 2002). Hemositlerden üretilen AMP'ler fagosit edilmiş bakterilerin öldürülmesine dahil edilmemiştir. Ancak bir yumuşakça ile yapılan çalışmalar,

hemositlerin bakterileri fagosite ederken antibakteriyel peptit mytilini hem ortama hem de fagolizozomlara saldığını göstermektedir (Mitta, 2000; Lavine ve Strand, 2002).

Nodülasyon ise kümelenmiş bakteri topluluklarının etrafının sarılmasıdır. Nodül oluşumu enkapsülasyon tepkisine benzemektedir (Lavine ve Strand, 2002; Kyriakides ve diğ., 1995). Skoleksin adlı bir böcek lektininin tütün boynuz kurdu *Manduca sexta*'da nodül oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir. Skoleksin yaralanma veya bakteriyel enfeksiyon sonucu epiderma ve orta bağırsak hücreleri tarafından üretilmektedir (Kyriakides ve diğ., 1995). Bununla birlikte nodül oluşumu birçok böcek türünde eikosanoidler veya hemositlerde proPO ve DOPA dekarboksilaz (Ddc) ile ilişkili görünmektedir (Tsakas ve Marmaras, 2010).

2.2.2. Böceklerde Hüморal Bağışıklık Yanıtı

Böcekler herhangi bir mikrobiyal tehdide karşı yüksek hücresel ve hüморal tepkilere sahip oldukları için çok gelişmiş bir hayatta kalma kabiliyetine sahiptirler (Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020). Hem böcek hem de memeli hüморal yanıtlarında melanizasyon, pıhtılaşma ve AMP salgılanması gibi süreçler söz konusudur (Şekil 2.4; Sheehan ve diğ., 2018; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020).

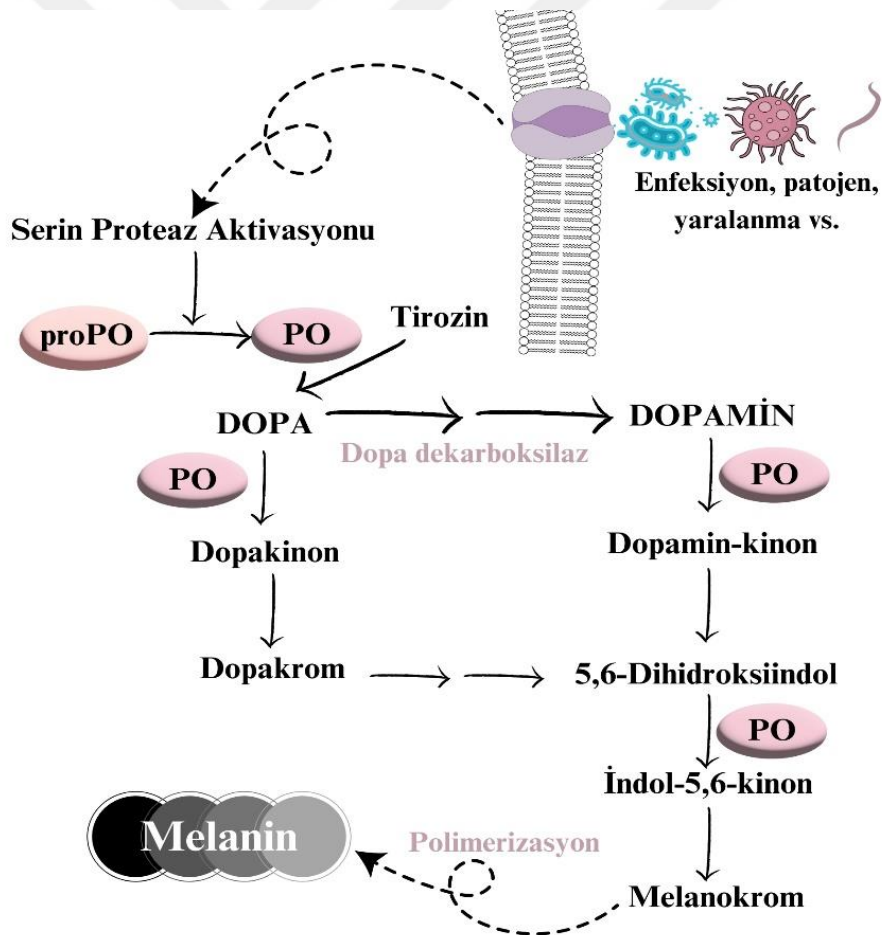


Şekil 2.4. Böceklerde hüморal doğuştan gelen bağışıklık yanıtı. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

Melanizasyon çok çeşitli patojenlere karşı savunmada önemli bir role sahiptir ve bazı lepidopteran ve dipteran böceklerde nodül, kapsül oluşumu ve yara iyileşmesinde görev alır (Tsakas ve Marmaras, 2010). Siyah pigment olan melaninin oluşumu, bir serin proteaz kaskadı tarafından aktif formuna dönüştürülen fenoloksidaz enzimi tarafından katalize edilir (Tsakas ve Marmaras, 2010). İnaktif proenzim olan profenoloksidaz hemositlerde sentezlenir ve hemositlerden serbest bırakıldıktan sonra ya aktif olarak kutikül içine taşınır ya da yaraların ve kapsüllenmiş parazitlerin etrafında birikir (Ashida ve Brey, 1995). PO'lar böcek hemolenfinde zimojen halde bulunmaktadır. Yaralanma ya da enfeksiyon durumunda immün sistemin bir parçası olarak savunmaya katkıda bulunurlar (Nappi ve Christensen, 2005; Hillyer, 2016). Bu aşamada oluşturulan immün cevabın seviyesini belirlemek, enkapsülasyon sırasında oluşan melanizasyonun yüzdesini belirlemek için uygun bir yöntemdir (Uçkan ve diğ., 2010; Altuntaş ve diğ., 2012). Birçok çalışma, profenoloksidazın ağırlıklı olarak hemositler tarafından, özellikle granülositler ve önositoidlerde sentezlendiğini göstermektedir (Iwama ve Ashida, 1986; Williams, 2007; Dubovskiy ve diğ., 2016). Melanizasyon için diğer bir potansiyel kaynak ise hemelonfte halihazırda var olan PO kaskad bileşenleridir (Nappi ve Christensen, 2005; Dubovskiy ve diğ., 2016). Buna ek olarak enkapsülasyon ve nodülasyonda görülen melanizasyon sırasında o-semikinon, hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve NO dahil olmak üzere bazı reaktif oksijen ve azot türleri üretilerek yabancı istilacının öldürülmesine yardımcı olur (Nappi ve Christensen, 2005; Dubovskiy ve diğ., 2016). Böcek proPO enzimi, omurgalı kompleman bileşen proteinleri C3 ve C4'ün tiyol-ester bölgesine benzerlik gösteren bir dizi içermektedir (Hall ve diğ., 1995).

Melanizasyon tirozin metabolizması ile ilişkilidir (Marmaras ve Lampropoulou, 2009). Tirozin aktif PO tarafından önemli bir dallanma noktası substratı olan DOPA'ya dönüştürülür. DOPA, Ddc tarafından dopamine dekarboksile edilebilir ya da PO tarafından dopakinona oksitlenebilir. Dopamin de önemli bir dallanma noktası substratıdır. PO veya diğer enzimler ile dopamin türevi metabolitler, nörotransmisyon, kutiküler sklerotizasyon, kinon ara ürünleri yoluyla kutiküler bileşenlerin çapraz bağlanması, fagositoz, yara iyileşmesi ve melanizasyona katılan çeşitli metabolik yollarda görev almaktadırlar (Şekil 2.5; Marmaras ve Lampropoulou, 2009; Tsakas ve Marmaras, 2010).

Böcek yaralanması veya yabancı partiküllerin istilası, proteolitik kaskadların aktivasyonunu indükler. Bu durum PO'nun aktivasyonu yoluyla hemolenf pıhtılaşmasıyla sonuçlanmaktadır (Nunes ve diğ., 2021). Hamamböceği *Leucophaea maderae*'de hemositler lipoforinlerin ve vitellogenin benzeri proteinlerin polimerizasyonunu katalizleyen kalsiyum bağımlı bir transglutaminaz salgılar. Bu proteinler, memelilerdeki Von Willebrand pıhtılaşma faktörüne homologdur (Tsakas ve Marmaras, 2010). En çok karakterize edilen mekanizma *Lymulus polyphemus*'daki mekanizmadır ve *Drosophila*'da da benzer bir mekanizma olduğu belirtilmiştir (Vilmos ve Kurucz, 1998). Buna göre lipopolisakkarit (LPS) ve β -1,3-glukan bir serin proteaz zincir reaksiyonunu indükler ve sonunda hemolenf pıhtılaşması gerçekleşir. Ayrıca serin proteaz melanizasyon kaskadını da aktive eder (Nappi ve diğ., 1995; Tsakas ve Marmaras, 2010).



Şekil 2.5. Böceklerde serin proteaz aktivasyonu sonucu melanin oluşumu. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

Antimikrobiyal peptitler genellikle yağ dokusundan üretilmekte ve hümmoral bağışıklık sistemini oluşturmaktadır. AMP sentezinin en fazla yağ dokuda gerçekleşmesine rağmen hemositler, kutiküler epitel hücreler, bağırsak, tükürük bezi ve üreme hücrelerinde de üretebildikleri görülmektedir (Dimopoulos ve diğ., 2000; Hoffmann ve Reichhart, 2002; Bartholomay ve diğ., 2004; Irving ve diğ., 2005; Strand, 2008; Vilmos ve Kurucz, 1998; Hillyer, 2016). Hümmoral bağışıklık sinyal yolları öncelikle Toll ve IMD yollarından (Böceklerde korunmuş NF- κ B bağışıklık sinyal yolları) oluşur. Bazı PAMP'ların (LPS, lipoteikoik asit, gram-negatif bakterilerin mezo-diaminopimelik asit ve lizin tipi peptidoglikanlar ve β -1,3-glukan) PRR'ler tarafından algılanması üzerine, Toll ve IMD sinyal yolları devreye girmektedir (Kim ve diğ., 2017). Bu sinyal yollarının aktivasyonu sonucu çeşitli AMP'lerin gen ekspresyonu indüklenir ve AMP'ler savunma elemanları olarak salgılanır (Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020).

Böceklerde bulunan AMP'lerin sayısı ve tipi türden türe değışiklik gösterir (Kokoza ve diğ., 2010), ancak 150'den fazla AMP izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Bu moleküller küçük, 12-50 amino asitli, katyonik peptitlerdir. Anyonik bakteri veya mantar membranlarını etkileyerek bozulmaya ve hücre ölümüne yol açarlar (Zasloff, 2002). AMP'ler genellikle dört grupta sınıflandırılır; sekropinler, sistein, prolin ve glisin bakımından zengin peptitler. Sekropinler ilk olarak *Hyalophora cecropia*'da bakteri enjeksiyonundan sonra izole edilmiştir (Hultmark ve diğ., 1980; Steiner ve diğ., 1981). AMP ile ilişkili genlerin kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile larval bağışıklık sisteminin farklı mikroorganizma, patojen vs. türlerine yanıt olarak belirli AMP'leri ifade etme yeteneğini anlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde bildirilen ve çalışmada bir kısmı kullanılan *G. mellonella* AMP'lerinin en önemli özellikleri şunlardır:

Sekropin: Filamentli mantarlara (*Aspergillus niger*), gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı aktiftir (Cytryńska ve diğ., 2007). Sentetik bir analogunun yakın zamanda insan patojenik *Listeria monocytogenes*'e karşı aktif olduğu gösterilmiştir (Vilcinskas, 2011).

Defensinler ve drosomisin: Sistein bakımından zengin peptitlerdir. Defensinler plazma membranında kanallar oluşturarak çoğunlukla gram-pozitif peptitleri yok eder ve hücre

lizisini gerçekleştirirler. Drosomisin ise antifungal bir aktiviteye sahiptir (Nappi ve Ottaviani, 2000).

Dipterisin: Sadece diptera türlerinde bulunan ve attasınlere benzer bir şekilde gram negatif bakteri enfeksiyonu üzerine indüklenen antibakteriyel bir peptittir (Nappi ve Ottaviani, 2000).

Lizozimler: Bakteri hücre duvarının peptidoglikanlarını parçalayan enzimlerdir. Diğer hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda ve bakteriyofajlarda da bulunurlar (Bulet ve diğ., 1999; Tsakas ve Marmaras, 2010).

Gallerimisin: Filamentli mantarlara karşı aktif olan ancak bakteriyel enfeksiyon tarafından güçlü bir şekilde indüklenmesine rağmen bakteri veya mayalara karşı aktif olmayan defensin benzeri bir peptittir (Schuhmann ve diğ., 2003).

Transferrin: Transferrin demir taşıyan ve demir bağlayan bir grup proteindir. Böceklerde transferrinler iki grupta sınıflandırılabilir (Thompson ve diğ., 2003; do Nascimento ve diğ., 2004). Bir gruptaki proteinler 6680 kDa glikoproteinlerdir ve sadece N-terminal bölgesi ferrik bağlayıcı bölgedir. Bu proteinler güveler, sinekler ve sivrisineklerde bulunmaktadır. Bununla birlikte hamamböceği ve termitlerde yer alan diğer grubun transferrinleri omurgalı transferrinleri gibi iki ferrik bağlayıcı bölgeye sahiptir (Han ve diğ., 2004). Transferrinin ekspresyonu istilacı patojenler, bakteriyel enfeksiyonlar, *Metarhizium anisopliae* mantarı ile arttığı gösterilmiştir (Yoshiga ve diğ., 1997; Seitz ve diğ., 2003; Han ve diğ., 2004)

Galiyomisin: Böcek defensinleri arasında yer alan galiyomisin, *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum* ve *Pyricularia grisea* gibi filamentli mantarlar ve *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans* gibi mayalara karşı aktiftir ancak antibakteriyel aktivite göstermemektedir (Lee ve diğ., 2004).

Kobatoksin: Katyonik bir peptit olan kobatoksin, bakteriyel meydan okumayı takiben *G. mellonella*'da güçlü bir şekilde indüklenir ancak antimikrobiyal aktivite açısından henüz karakterize edilmemiştir (Schuhmann ve diğ., 2003).

Morisinler ve gloverinler: Morisin benzeri peptitler ve gloverinler sadece Lepidoptera ile sınırlıdır. *G. mellonella*'da yedi farklı morisin benzeri peptiti kodlayan sekiz tane gen bilinmektedir. Bu genler özellikle filamentli mantarlara ve bir dereceye kadar da maya, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı aktiftir (Brown ve diğ., 2008). Glisin kalıntıları ile zenginleştirilmiş gloverinler bazik ve ısıya dayanıklı proteinlerdir (Vogel ve diğ., 2011). *Escherichia coli*, gram-pozitif bakteriler, mantarlar ve virüslere karşı aktiftirler (Wojda, 2017).

p38 MAPK: MAPK kaskadları gelişim, proliferasyon, farklılaşma, endositoz, apoptoz ve migrasyon gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen serin-treonin protein kinazlardan oluşmaktadır (Huang ve diğ., 2009; Qiu ve diğ., 2017). p38 MAPK'nin genellikle inflamatuvar sitokinler ve çevresel stresler tarafından indüklenen sinyal iletilmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Ono ve Han, 2000; Ashwell, 2006). Virüse yanıtta p38 MAPK'nin önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir (Shi ve diğ., 2014; Cancino-Rodezno ve diğ., 2010). *Drosophila* ve *G. mellonella*'da patojenik bakteri ve mantarlara karşı p38 MAPK aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2010; Wojda ve diğ., 2014; Qiu ve diğ., 2017).

Sekropin ve difensin gibi AMP'ler birçok türde korunmuştur (Kokoza ve diğ., 2010). Difensinler ve difensin benzeri peptitler birçok böcek taksonunda, bitkilerde ve omurgalılarda rapor edilmiştir. AMP'lerin büyük kısmının bakteriyel membranı bozduğu belirtilmiştir (Lemaitre ve Hoffmann, 2007; Melo ve diğ., 2009).

AMP'lerin indüksiyonu ve ekspresyonu belirgin şekilde özel ve spesifik enfeksiyonlara bağımlı olabilmektedir (Tauszig ve diğ., 2000). Örneğin filamentli mantarlar drosomisin ve metçnikovin üretimini aktive ederken, dipterisin, drososin, sekropin ve attasin gibi antibakteriyel bileşiklerin üretimi çoğunlukla gram-negatif bakteriler tarafından uyarılır. gram-pozitif bakterilere yanıt olarak üretilen AMP'lerin tek örneği defensindir (Hoffmann, 2003; Keshavarz ve diğ., 2019; Park ve diğ., 2019; Tauszig ve diğ., 2000). Genetik analizler böcek AMP genlerinin promotör bölgelerinin, aynı nükleotit motiflerini içerdikleri için memelilerdeki nükleer faktör kappa B/Relish (NF-κB/Rel) bağlanma bölgelerine benzediğini ortaya koymuştur (Hoffmann, 2003). Bu nedenle iki farklı NF-κB benzeri sinyal iletim yolu, Toll ve IMD sırasıyla mantar ve gram-pozitif ve gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlar tarafından aktive edilen AMP

indüksiyonlarından sorumludur (İmler ve Zheng, 2004; Ali Mohammadie Kojour ve diğ., 2020).

2.3. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

NP'ler kullanıldığı uygulama veya araştırma alanına göre farklılık göstermektedir. Sınıflandırılmaları için dikkate alınan kriterler köken, morfoloji, kimyasal özellik-bileşenler ve boyutsal özelliklerdir (Şekil 2.6) (Dolez, 2015; Khan ve Hossain, 2022). Kökenine bağlı olarak NP'ler; doğal, kazara oluşan ve mühendislik ürünü nanoparçacıklar şeklinde ayrılmaktadır (Dolez, 2015; Khan ve Hossain, 2022) (Şekil 2.6.A). Morfolojiye göre NP'ler; küresel, üçgen, kübik, altıgen, oval şekilli, prizma şekilli, çubuk benzeri, tüp benzeri, sarmal vb. şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 2.6.B). Boyutsal olarak NP'ler; bir nanoparçacığın tüm dış boyutları nano ölçekte sıfır boyutlu (0 B), nanometrik boyut aralığının dışında sadece bir boyut içeren ve diğer iki boyutu nano ölçek aralığında olan nanoparçacıklara tek boyutlu (1 B), nanometrik boyut aralığının dışında iki boyuta sahip (2 B), üç dış boyuttan hiçbirisi nano ölçekte olmamasına rağmen içsel olarak nano ölçekte özellik gösteren (3 B) şeklinde sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.6.D). NP'lerin genellikle kimyasal yapılarına-bileşenlerine göre sınıflandırılması yaygındır (Şekil 2.6.C). Buna göre;

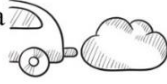
- Metalik NP'ler; üstün fiziksel özellikleri nedeniyle kullanılan en eski ve en popüler NP'lerdir. Günümüzde biyoaktif ilaçların hedefli salımı, gen dağıtımı için araç olarak, biyosensörler, görüntüleme, antimikrobiyal ajanlar vb. gibi biyomedikal sektörde çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadırlar (Hossain ve diğ., 2021). Altın, alüminyum, gümüş, bakır, demir, kurşun, kadmiyum, kobalt ve platin en yaygın metal NP'lerdir.
- Yarı iletken NP'ler; iletkenler ve yalıtkanlar arasında elektriksel iletkenliğe sahiptir. Geniş yüzey alanları ve bu ölçekte kuantum boyutu etkisi nedeniyle nano ölçek seviyesine indirildiklerinde özelliklerinde ciddi değişiklikler sergilerler. Bu tür değiştirilebilir özellikler, yarı iletken nanoparçacıkları nano ölçekli ışık yayan cihazlar, entegre devreler, lazer teknolojisi, biyolojik algılama, etiketleme ve görüntüleme gibi çok çeşitli endüstriyel, elektriksel ve biyomedikal uygulamalar için çok umut verici adaylar haline getirmektedir (Hossain ve diğ., 2021).

A. Kökenlerine göre

Doğal: petrol, deniz dalgaları, kum fırtınaları, volkanlar, orman yangınları vb.



Kazara: motor egzozu, malzeme kaynağı, gıda işleme, sigara dumanı, bina yıkımı vb.



Mühendislik: modern ekipmanlar kimyasal katalizörler ve yeni sentez teknikleri



B. Morfolojilerine göre



Küresel



Üçgen



Kübik



Prizma



Oval



Altıgen



Çubuk



Sarmal



Tüp

C. Kimyasal yapıları-bileşenlerine göre

Metalik: çinko oksit, demir oksitler, alüminyum oksit, silika, bakır oksit, titanyum oksit nanopartikülleri vb.

Seramik: hem metallerin hem de metaloidlerin oksitleri, karbürleri, fosfatları ve karbonatları

Yarı iletken: Hematit nanopartikülleri, titanyum oksit nanopartikülleri vb.

Lipid bazlı: katı lipid NP'ler, nano lipid taşıyıcılar, lipoproteinler, lipozomlar, lipopleksler vb.

Karbon bazlı: elmas, grafen, fulleren, karbon nanotüpler, karbon nanolifler, karbon siyahı, karbon noktalar vb.

Polimerik: poli laktik asit, poliglikolik asit, poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit), polistiren vb.

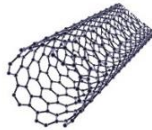
D. Boyutlarına göre

0 B



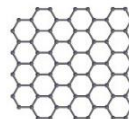
Kuantum noktalar

1 B



Karbon nanotüpler, nanoteller, nanorodlar

2 B



Grafen

3 B



Dendrimer, Fulleren

Şekil 2.6. Nanopartiküllerin sınıflandırılması. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

- Karbon bazlı NP'ler; atomik yapısındaki dört değerlik elektronu nedeniyle karbon, yapısal olarak birbirinden farklı birden fazla allotrop oluşturabilen az sayıdaki

elementten biridir (elmas, grafen, fulleren, karbon nanotüpler, karbon nanolifler, karbon siyahı ve karbon noktalar).

- Seramik NP'ler; nano ölçekli uzunluk ölçeğinde inorganik katılardan yani hem metaller hem de metaloidlerin oksitleri, karbürleri, fosfatları ve karbonatlarından oluşur (Diao ve diğ., 2003). Fiziksel bozulmaya karşı koruma sağlayan gözenekli özellikler gösterirler.
- Lipit bazlı NP'ler; nanotaşıyıcılar olarak klinik açıdan gelişmiş bir sistemdir. Bu partiküller kanser tedavisi ve ilaç salım sistemlerinde uygulanmaktadırlar. Benzersiz kimyasal yapıları onları hidrofobik, hidrofilik ve amfifilik molekülleri taşıma kabiliyetiyle çok yönlüdür. Ayrıca yüksek biyoyumluluk gösterirler ve neredeyse hiç toksisite göstermezler (Khan ve Hossain, 2022; Hossain ve diğ., 2021).
- Polimerik NP'ler; polimerik çekirdek içine hapsedilmiş veya yüzeye adsorbe edilmiş aktif bileşiklerden oluşan kolloidal yapıları ifade eder. Biyoyumlulukları, kontrollü salım profilleri, toksik ve immünojenik olmayan özellikleri nedeniyle umut verici ilaç taşıyıcılarıdır. Morfolojik olarak polimerik NP'ler nanokapsüller veya nanoküreler olarak sınıflandırılabilir. Bu iki tür arasındaki ayırt edici faktörler şunlardır: biyoaktif bileşikler nanokapsüllerde polimerik kabuk içinde hapsedilirken, nanokürelerde polimer matris içine kimyasal olarak entegre edilir (Khan ve Hossain, 2022).

2.4. Nanopartiküllerin Özellikleri, Kullanım Alanları, Oluşumları ve Etkileri

NP'lerin geniş yüzey alanlarına bağlı belirgin özellikleri bulunmaktadır (Akbari ve diğ., 2011). Dahası bir parçacığın boyutu, yük taşıyıcının (elektronlar ve boşluklar) “de Broglie dalga boyu”na veya ışığın dalga boyuna yakın veya daha küçük karakteristik uzunluk ölçeği ile nano ölçeğe yaklaştığında, kristal parçacığın periyodik sınırları yok olur veya amorf parçacık yüzeyindeki atomik yoğunluk değişir. Tüm bu özelliklerinden dolayı, NP'lerin fiziksel ve mekanik özelliklerinin birçoğu mikropartiküller ve yığın malzemelerden oldukça farklıdır ve çok çeşitli yeni uygulamalar ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca mekanik mukavemette birçok cihazın yüzey modifikasyonu için veya nano-üretim/fabrikasyon vb. kalitesini artırmak için daha etkili seçenekler sunar (Guo ve diğ., 2013).

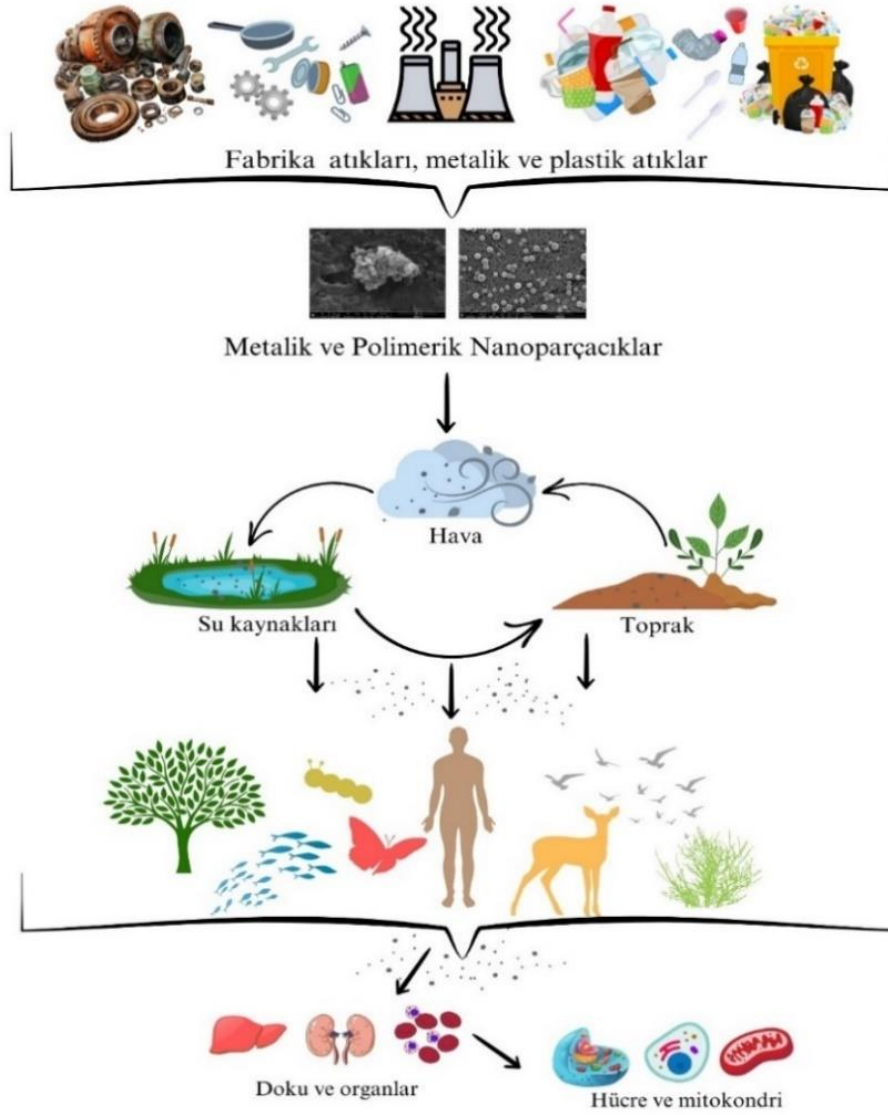
Küçük boyutlu NP'ler serbest halde çok yüksek hareket kabiliyetine sahiptirler. NP'lerin özgülük, enkapsülasyon, stabilite ve biyouyumluluk gibi çok yönlü özellikleri bulunmaktadır. Bu parçacıklar iletken, yarı iletken, tıbbi cihaz, sensör, kaplama, katalitik ajan ve ayrıca tarımsal bilim alanlarında pestisit olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte matris malzemelerinde kapsüllenmiş veya adsorbe edilmiş NP'ler, ilaç moleküllerinin salımı için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Mohanraj ve Chen, 2006; Manmode ve diğ., 2009; Akbari ve diğ., 2011). Metalik nanoparçacıklarda yüzey plazmonlarının uyarılması kaynaklı özel optik özellikler biyotıp, enerji ve çevre koruma teknolojilerinde kullanılabilir (Guo ve diğ., 2013). Manyetik NP'ler süperparamanyetik hale gelebilme ve sıfır remanans ile dış manyetik alanlara çok hızlı yanıt verebilme özellikleri nedeniyle biyomedikal görüntüleme ve bilgi depolama teknolojisi gibi uygulamaların temelini oluşturmaktadır (Lu ve diğ., 2007; Zhang ve diğ., 2010; Guo ve diğ., 2013). Nanoparçacıkların elektrokimyasal reaksiyonların katalizi ve elektron transferinin artırılması gibi bazı temel işlevleri, onları yeni elektrokimyasal algılama sistemlerinin tasarlanmasında kullanışlı hale getirmektedir (Luo ve diğ., 2006; Guo ve diğ., 2013). Özetle olağanüstü fiziksel ve kimyasal yapılarından dolayı NP'ler biyoloji, kimya, eczacılık, malzeme bilimi, tıp, enerji, kozmetik, çevre iyileştirme, tekstil, gıda ve tarım gibi birçok alanda büyük ilgi görmektedir (Huang ve diğ., 2007; Yang ve diğ., 2015; Murugan ve diğ., 2017; Duhan ve diğ., 2017; Benelli, 2018).

Doğal ya da antropojenik faaliyetlerle NP'ler su, toprak ve hava yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak ekosisteme karışabilmektedir (Şekil 2.7). NP'lerin çevresel arıtma için uygulanması, mühendislik ürünü NP'lerin kasıtlı olarak toprağa veya sucul sistemlere dökülmesi ile sonuçlanır (Khan ve diğ., 2019). Bu partiküller farklı bölgelere taşınabilmekte ve çökelti olarak toprak içerisinde birikebilmektedir. Sucul sistemlerdeki partiküller ise suda bulunan organik maddeler ile etkileşime girerek sert suda ve deniz suyunda birikebilirler (Tripathi ve diğ., 2012). NP'ler sert suda ve deniz suyunda toplanma eğilimindedir ve suda bulunan belirli organik maddelerden veya diğer doğal partiküllerden (kolloidler) büyük ölçüde etkilenirler (Handy ve diğ., 2008). Ayrıca son derecede reaktif olan diğer kirletici parçacıklarla etkileşime girerek yeni toksik bileşikler oluşturabilirler (Tripathi ve diğ., 2012). Potansiyel olarak toksik olan bu bileşikler içeren çeşitli kirleticiler yoluyla NP'ler besin zincirine de girebilmektedir

(Maharramov ve diğ., 2019). NP'ler ile kontamine olmuş topraklardaki bitkilerin üretiminin yapılması durumunda, bu bitkiler ile beslenen canlıların sağlığı için önemli bir tehdit unsuru oluşturabilirler (Rico ve diğ., 2011; Rajput ve diğ., 2018). Nano boyutlu partiküllerin dağılma durumunun ekotoksisteyi değiştirebileceği bildirilmiştir (Khan ve diğ., 2019). NP'lerin vücuda alınmasında olası yollar: soluma (akciğerler yoluyla NP'lerin alınması); sindirim sistemi (NP'ler içeren su ve yiyeceklerin alınması); deri ve mukoza zarlarından giriş; NP'lerle kirlenmiş yüzeylere maruz kalma; suda yaşayan organizmaların solungaçlarından dolaşım sistemine giriş şeklinde sıralanabilir (Maharramov ve diğ., 2019).

NP'lerin toksisitesi boyutları, şekilleri, spesifik yüzey alanları, yüzey yükleri, katalitik aktiviteleri ve aktif grupların varlığı ya da yokluğu gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır (Sukhanova ve diğ., 2018). Partiküller epitel ve endotel bariyerlerden lenf ve kana nüfuz ederek kan dolaşımı ve lenf akışı ile beyin, kalp, karaciğer, böbrekler, dalak, kemik iliği ve sinir sistemi dahil olmak üzere farklı organ ve dokulara taşınabilmektedir (Dukhin ve Labib, 2013; Khan ve diğ., 2019) ve transsitoz mekanizmaları ile hücrelere taşınabilir veya hücre zarından basitçe difüze olabilirler. Sindirim yoluyla kan dolaşımına erişimi arttırabilir. Bazı nanomateriyaller ise doğrudan cilde nüfuz edebilir (Sukhanova ve diğ., 2018). Bu partiküllerin ayrıca trombosit agregasyonunu artırarak tromboza (Radomski ve diğ., 2005), üst ve alt solunum yollarında iltihaplanmaya, nörodejeneratif bozukluklara, felce, miyokard enfarktüsüne ve diğer bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (Lucchini ve diğ., 2012; Madl ve diğ., 2014). NP'ler aynı zamanda mitokondri ve çekirdek gibi hücre organellerine de girebilmektedir. Bu durum hücre metabolizmasını değiştirebilmekte, deoksiribonükleik asit (DNA) lezyonlarına, mutasyonlara ve hücre ölümüne neden olabilmektedir (Barua ve Mitragotri, 2014; Sukhanova ve diğ., 2018). Yüksek dozda NP'lere maruz kalma, hücrel stres tepkilerini değiştirmektedir. Bunun sonucunda organel otofajisini ve apoptozu tetikleyebilen sinyalleşme yollarını etkin hale getirebilmektedir (Arul Prakash ve diğ., 2011; Cameron ve diğ., 2018; Alaraby ve diğ., 2019; Poon ve Patel, 2020). Öte yandan çeşitli konsantrasyon seviyelerinde nanoparçacıkların çevre ve insanlarda uzun süreli maruz kalma nedeniyle olumsuz sağlık etkileri potansiyeli henüz tam anlamıyla belirlenmemiştir ve bu durum nanotoksisteyi ilgi odağı haline getirmiştir

(Peralta-Videa ve diğ. 2011; Rajput ve diğ., 2018). NP'lerin çevresel etkilerinin gelecekte artması beklenmektedir (Khan ve diğ., 2019).



Şekil 2.7. Nanoparçacıkların oluşumu ve dağılımı. Fabrika atıkları, metalik ve polimerik atıklar sonucu sıcaklık, basınç, UV gibi etkenlerle oluşan nanoparçacıklar doğal veya antropojenik faaliyetlerle hava, toprak ve su kaynaklarına, oradan da insan ve diğer canlılara geçerek doku, organ ve hücreleri etkilemektedir. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

2.4.1. Alüminyum Oksit Nanopartiküller

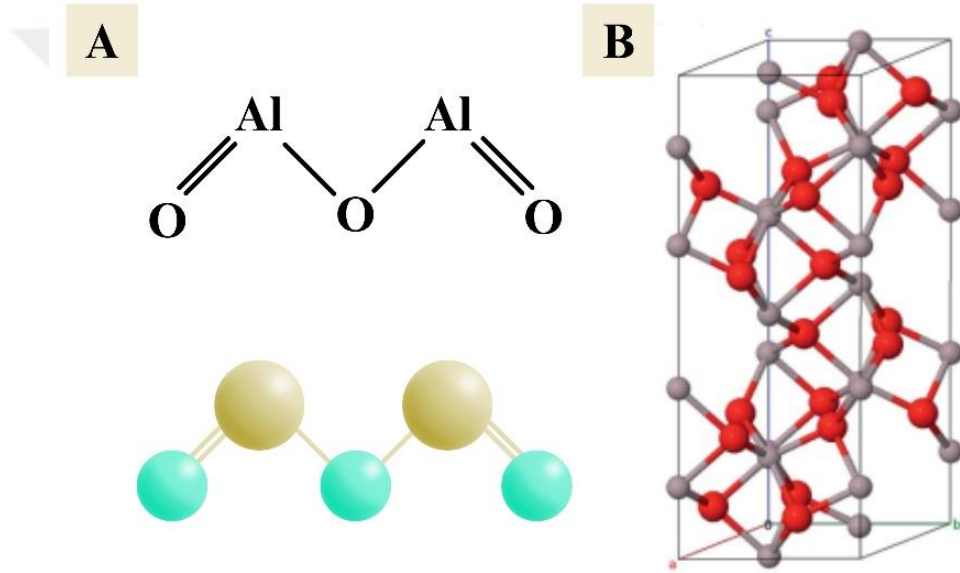
Yüksek iletkenliğe sahip metal ve metal oksit NP'ler yüksek yüzey enerjileri ve küçük moleküllerin güçlü adsorpsiyonu sayesinde, biyomoleküllerin tespiti ve

görüntülenmesinde kullanılmaktadırlar. Bu nanoparçacıklar süperparamanyetizma, katalitik davranış, üstün mekanik güç ve optik özelliklere sahiptirler. Ayrıca kuantum boyutu etkisi nedeniyle, erime noktaları ve adsorptif özellikleri, belirli mühendislik amaçlarına hizmet etmek için kolayca modüle edilebilmektedir (Khan ve Hossain, 2022). Metallerin oksitleri, serbest elektronlar oksijen ile bağlı olduğu için kimyasal olarak metallerden daha karardır. Metal oksitler iletken, yarı iletken veya yalıtkan özellikler sergiler. Bu parçacıklar alkalın ve lityum iyon pil hücreleri, güneş emiciler ve enerji toplayıcılar, piezoelektrik, ferroelektrik ve manyetik cihazlar, lazerler, süper iletkenler vb. gibi çeşitli uygulamalarda kullanılabilmektedirler. En yaygın kullanılan metal oksit parçacıklar; çinko oksit (ZnO), demir oksitler, Al_2O_3 , silisyum dioksit (SiO_2), bakır oksit (CuO), magnezyum oksit, nikel oksit, titanyum dioksit (TiO_2), seryum dioksit (CeO_2) ve zirkonyum dioksittir (Manzoor ve diğ., 2021; Khan ve Hossain, 2022).

Alüminyum yer kabuğunda en bol miktarda bulunan metalik elementtir. Özellikle mekanik özellikleri sayesinde farklı alaşım türleri oluşturarak çok geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir (Johnson ve Sanders, 2012; Poborilova ve diğ., 2013). Alüminyum, hücre membranını bozucu bir fonksiyona sahip olabilir ve sonuçta Amyotrofik Lateral Skleroz, Alzheimer hastalığı, demans ve Parkinson gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir faktör olarak gösterilmektedir (Vorbrodt ve diğ., 1994; Maya ve diğ., 2016). Alüminyuma maruz kalma ve vücutta birikmesi sonucunda oksidatif stres, çeşitli inflamatuvar olaylar ve kan beyin bariyerinin bozulması gibi sonuçları hakkında da kanıtlar bulunmaktadır (Lockman ve diğ., 2004; Yang ve Watts, 2005; Chen ve diğ., 2008a). Ayrıca, farelerde ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda NP'lerin beyindeki sitotoksiste, genotoksiste ve inflamatuvar olayları indükleyerek nörotoksisteyi uyurabildiği ve bilişsel işlevleri değıştirebildiği kaydedilmiştir (Shrivastava ve diğ., 2014).

Alüminyum çok hafif, sünek, mükemmel ısı ve elektrik iletkenidir ve havada bir oksit tabakası oluşturarak kimyasal karardılık kazanır. Gözenekli nanomalzemelerin bir sınıfı olan Al_2O_3 NP'lere yapısal açıdan bakıldığında, üç oksijen atomunun gümüş renkte metal olan iki alüminyum atomunu çevrelediği bir yapıdan oluşmaktadır (Şekil 2.8.A). Bu NP'ler geniş bir sıcaklık aralığında termodinamik olarak karardır ve korindon

benzeri bir yapıya sahiptir. Oksijen atomları altıgene benzer paketlemeyi benimsemekte ve Al^{+3} iyonları kafesteki oktahedral bölgelerin üçte ikisini doldurmaktadır (Şekil 2.8.B; Sadiq ve diğ., 2009; Peintinger ve diğ., 2014; Hassanpour ve diğ., 2018). Diğer metal oksit nanoparçacıklara benzer şekilde, Al_2O_3 NP'ler de kolaylıkla işlenebilmektedir. Bu nanomalzemeler yüksek yüzey alanının yanı sıra mekanik mukavemete sahip olup yüksek sıcaklık ve aşındırıcı ortam gibi zorlu koşullara karşı olağanüstü kimyasal kararlılığa sahiptirler. Düşük elektrik iletkenliğine sahiptirler. Buna ek olarak biyoinertlik ve kolay yüzey işlevselleştirme özellikleri sayesinde biyolojik ortamda kullanımları kolaylaşmaktadır (Hassanpour ve diğ., 2018).



Şekil 2.8. Alüminyum oksitin kimyasal yapısı A) Alüminyum oksit bileşiği; Al: sarı, O: yeşil, B) korindon benzeri yapı, konvansiyonel altıgen birim hücre; Al: kırmızı, O: gri. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

Al_2O_3 NP'lerin 2005 yılında nano boyutlu küresel nanomalzeme üretiminin yaklaşık %20'sini oluşturduğu ve en çok üretilen kimyasallar arasında yer aldığı bildirilmiştir (Oesterling ve diğ., 2008; Chen ve diğ., 2008a; Arul Prakash ve diğ., 2011; Lu ve diğ., 2015; Li ve diğ., 2016). Katalitik aktiviteleri ve yüksek enerji salımları nedeniyle Al_2O_3 NP'ler, yanma hızını ve kararlılığını artırmak için roket yakıtında toz olarak kullanılmaktadır (Temple ve Bagnall, 2011). Ayrıca fotovoltaiik güneş pillerinde kullanılmaya uygundurlar. Al_2O_3 NP'ler özellikle kozmetikte önemli bir yere sahiptir.

Bununla birlikte Al_2O_3 bazlı seramikler yüksek derecede mekanik mukavemete, sertliğe, aşınma direncine ve iyi biyouyumluluğa sahip olmaları nedeniyle diş ve kemik implantlarında kullanılırlar (Poborilova ve diğ., 2013). Bunlara ek olarak birçok araştırmacı artık NP'lerin güçlü insektisitler olarak kullanım olasılığını da araştırmaktadır. Özellikle artan yüzey alanı/hacim oranı nedeniyle NP'lerin daha reaktif hale gelebildiği ve bunun da böcek öldürücü olmalarının nedenlerinden biri olduğu bildirilmiştir (Debnath ve diğ., 2011; Das ve diğ., 2019).

Spesifik yoğunluğa sahip alüminyum, kurşun, civa, arsenik, nikel ve kadmiyum gibi hava kirliliğine neden olan metaller oksidatif stresi indükleyerek mitokondriyal fonksiyonu bozmaktadır (Alissa ve Ferns, 2011; Rehman ve diğ., 2018). Al_2O_3 NP'ler içme suyu, yiyecek alımı, solunum ve cilt teması ile vücuda alınabilir ve dokularda birikebilir. Bunların toksik etkileri nedeniyle insan sağlığı ve çevresel riskleri hakkında artan bir endişe bulunmaktadır (Poborilova ve diğ., 2013). Bu NP'lerin çeşitli organizmalarda biyoakümülyasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (Handy ve diğ., 2008; Stanley ve diğ., 2010; Coleman ve diğ., 2010). Çok yüksek yüzey reaktivitesine sahip olmaları, sağlık veya çevre üzerinde olumsuz etkileri olabileceği anlamına gelmektedir (Handy ve diğ., 2008). Alüminyumun toksisitesi nispeten araştırılmış ve birçok yayında tartışılmış olmakla birlikte, Al_2O_3 NP'lerin toksisitesi son zamanlarda ilgi odağı olmuştur.

In vitro çalışmalar Al_2O_3 NP'lerin hücre canlılığını azalttığı, oksidatif stresi, mitokondriyal disfonksiyonu artırdığı, kan-beyin bariyerindeki protein ekspresyonunu değiştirdiğini, genotoksisite, hücrelerde morfolojik anormallikler, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres yoluyla oluşan sitotoksisite ve membran hasarına neden olduğunu ortaya koymuştur (Alshatwi ve diğ., 2012; Kim ve diğ., 2010; Pakrashi ve diğ., 2011; Yu ve diğ., 2011; Zhang ve diğ., 2011; Di Virgilio ve diğ., 2010; Srikanth ve diğ., 2015). Memelilerde yapılan *in vivo* çalışmalarda Al_2O_3 nanoparçacıklarının hepatik ve renal toksisite, sistemik inflamasyon, akciğer dokusunda akümülyasyon, kemik iliğinde DNA hasarı, uzamsal bellek kaybı, oksidatif stres gibi etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (Yousef ve diğ., 2019; Kim ve diğ., 2018; Jalili ve diğ., 2020). Böceklerde ise Al_2O_3 NP'lerin genellikle entomotoksik etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalarda nano Al_2O_3 parçacıkları böcek sağkalımını azalttığı, fenotipik anormallikler, davranışsal kusurlar,

DNA hasarı, hücre apoptozu ve oksidatif hasar oluşturduğu belirtilmiştir (Das ve diğ., 2019; Anand ve diğ., 2019; Arafat ve diğ., 2023; Tuncsoy ve Tuncsoy, 2023).

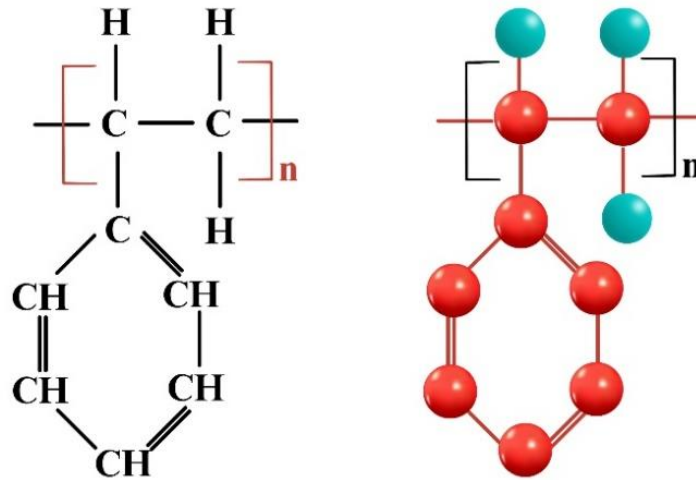
2.4.2. Polistiren Nanopartiküller

Plastikler modern toplumun gelişimini destekleyen yeni bir çağ başlattı. PlasticsEurope pazar araştırma grubu, 2019 yılında küresel plastik üretiminin 368 milyon tona ulaştığını bildirmiştir (Europe, 2020). Plastikler mikroelektronik, gıda ve su güvenliği, ulaşım, çeşitli endüstriyel uygulamalar, sağlık hizmetleri ve nüfusun güvenliğine büyük katkıda bulunmaktadır. Plastikler genellikle düşük maliyetle üretilen hafif ve esnek malzemelerdir (Nasir ve diğ., 2015). İnşaat sektöründe, elektrik ve elektronik, bilgisayarlar/mobiller, enerji üretimi, iletimi, dönüşümü ve dağıtımındaki uygulamalarda çok fazla kullanılmaktadırlar. Plastiklerin çok düşük ağırlığı, taşımacılık endüstrisinin tüm dalları ve uzay araştırmaları için çok önemlidirler (Naser ve Chehab, 2020). Bununla birlikte en büyük ve en önemli kullanım alanı ambalajlamadır. Kaplar, şişeler, variller, tepsiler, kutular, bardaklar ve otomat ambalajları, bebek ürünleri ve koruyucu ambalajlar dahil olmak üzere çok sayıda ambalaj uygulamasında kullanılır. Plastikler ayrıca tek kullanımlık tıbbi aletler, hatta bazı tıbbi ameliyatlar ve nakiller için de kullanılmaktadır (Klemeš ve diğ., 2021). Son yıllarda birçok ülkede atık ihracatının yasaklanmasıyla birlikte kesin geri dönüşüm oranı sorgulanmaya başlanmıştır (Brooks ve diğ., 2018). Plastik atıklar geri dönüşüm amacıyla gelişmekte olan ülkelere gönderilmektedir, ancak ne kadarının geri dönüştürüldüğü ve yeni uygulamalarda kullanıldığı konusu şüphelidir. Çevreye döküntü veya mikro/nano-plastik olarak sızan plastik atıklar ekolojik tehdit oluşturabilir ve hatta besin zincirine girebilir (Revel ve diğ., 2018). Diğer endişe ise çoğunlukla petrokimyasallardan elde edildiği için fosil kaynakların tükenmesidir. Plastiğin %90'ından fazlası petrol bazlıdır (Klemeš ve diğ., 2021).

Plastiklerin çoğunluğu polietilen (PE, yüksek ve düşük yoğunluklu), PS, polipropilen, polivinil klorür, poliüretan (PÜ) ve polietilen tereftalat olmak üzere sentetik organik polimerlerden yapılır. Buna ek olarak mukavemet, renklendirme veya alev geciktirici gibi özellikleri geliştirmek için katkı maddeleri eklenebilmektedir. MP'lerin etkilerini anlamak için, akıbetlerini ve potansiyel etkilerini ve bazıları için kanserojen veya endokrin bozucu olarak sınıflandırılabilen katkı maddelerini (örneğin Bisfenol A,

ftalatlar, polibromlu difenil eterler ve metaller veya metaloidler) incelemek çok önemlidir (Galloway, 2015). Plastik maddelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçler sonucunda zamanla parçalanarak mikro ve nano boyutlu partiküllere dönüşmesi muhtemeldir (Hidalgo-Ruz ve diğ., 2012). Bu partiküllerin insan sağlığı üzerindeki toksik etkileri ile ilgili endişeler dile getirilmiştir, ancak araştırmaların hala yeterli düzeyde olmadığı bildirilmiştir (Galloway, 2015; Revel ve diğ., 2018). Nanoteknolojik uygulamaların devamlı geliştirilmesi nedeniyle, NP'lerin insan sağlığı üzerindeki olumsuz sonuçları ve diğer tüm etkileri hakkında daha net bir tablo elde etmek için nano-biyo-etkileşimleri araştırmak son derece önemlidir (Oberdörster ve diğ., 2005; Pluskota ve diğ., 2009).

Plastik endüstrisinde en fazla kullanılan plastiklerden biri ise PS'dir ve yılda birkaç milyon ton üretilmektedir. PS (vinilbenzen) etilen ve benzenden üretilen stiren monomerlerinin polimerizasyonu sonucu oluşan aromatik bir polimerdir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Polistirenin kimyasal yapısı ((C₈H₈)_n). Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

PS'nin üretimi, stiren monomerlerinin oluşumuna yol açan etilbenzenin katalitik dehidrojenasyonu ile gerçekleştirilir (Kik ve diğ., 2020; Sarker ve diğ., 2012). PS yarı saydamlık, dayanıklılık ve kolayca boyanabilme özelliklerine sahip termoplastik bir polimerdir. Katı bir malzeme olarak PS CD, oyuncak, diş fırçası vb. üretiminde, ısı

yalıtımı malzemesi olarak, soğutma kulelerinde, köpük boru, kauçuk, çeşitli aletler, otomobil parçaları, paneller ve elektronik aletlerin plastik aksamalarında sıklıkla kullanılır (Sarker ve diğ., 2012). PS aynı zamanda sınırlı elastikiyet ile karakterize edilen, genişletilmiş veya eritilerek şekillendirilen strafor üretiminde (Kik ve diğ., 2020), tek kullanımlık tepsi, tabak, bardak yoğurt kapları, ayran kapları gibi tüketimi oldukça fazla olan ürünlerin yapımında kullanılmaktadır (Sarker ve diğ., 2012). Ayrıca çeşitli ambalaj ürünlerinin üretimi ve oyuncak, klips ve ofis malzemelerinin üretimi için de kullanılmaktadır (Kik ve diğ., 2020). Biyo-uyumluluk özelliği PS'nin laboratuvar ekipmanı ve biyomedikal cihazların üretiminde yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Kik ve diğ., 2020). Hücre kültürlerinde kullanılan petri kaplarının yapısında da bulunmaktadır (Sarker ve diğ., 2012).

PS NP'ler, çeşitli boyut aralıklarında kolayca sentezlenir ve partikül dış yüzeyine birçok farklı fonksiyonel grup kolayca eklenir (Barbato ve diğ., 2020). Son ekotoksitesite çalışmaları, PS NP'lerin genellikle yüzey işlevselleşmesinin çeşitli organizmalar üzerinde hafif veya şiddetli etkilere neden olduğunu göstermiştir (Varó ve diğ., 2019). PS NP'ler bu özellikleri sebebiyle *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için yaygın olarak kullanılan model parçacıklardır (Rejman ve diğ. 2004; Yacobi ve diğ., 2008). Yapılan çalışmalarda, katyonik PS NP'lerin hücre hatlarında sitotoksitesite araştırılmış ve hücre hatlarının neredeyse yarısında sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, PS NP'lerinin biyoyumluluğu büyüklüğe ve doza bağlıdır. Genellikle küçük (20 nm) PS NP'lerin daha belirgin sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Fröhlich ve diğ., 2009; Fröhlich ve diğ., 2012). Modifiye edilmiş negatif ve pozitif yüklü PS NP'lerin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, pozitif yüklü NP'lerin daha toksik olduğu gösterilmiştir (Sukhanova ve diğ., 2018). Ayrıca PS NP'lerin oksidatif DNA hasarının, apoptoz veya kalıcı büyüme durması gibi yanıtları indükleyebileceğine dair sonuçlar da bulunmaktadır (Wang ve diğ., 2013; Anguissola ve diğ., 2014; Koprinarova ve diğ., 2018). Bununla birlikte, PS NP'ler gibi ağır metalleri olmayan NP'ler, esas olarak makromoleküllere bağlanarak hücre metabolizmasına müdahale etmektedirler (Frohlich, 2013).

Günümüzde nanoparçacıklar ve canlılar arasındaki ilişkileri anlamak için nano-biyo-etkileşimleri belirlemek son derece önemlidir. Özellikle son yıllarda NP toksitesitesine

ilişkin verilerin çoğu *in vitro* deneylerden elde edilmektedir. Memeli modellere alternatif olarak, canlı organizmaların NP'lere verdiği fizyolojik tepkileri taklit eden *in vivo* modellerin kullanılması kritik önem taşımaktadır (Valdiglesias ve diğ., 2010; Demirtürk ve diğ., 2023). Büyük balmumu güvesi *G. mellonella* larvaları, NP uygulamasının kolaylığı ve ortalama 37 °C'de yaşama kabiliyeti nedeniyle *in vivo* model olarak popülerlik kazanmaktadır (Moya-Anderico ve diğ., 2021; Demirtürk ve diğ., 2023). Bu organizma nesilden nesile epigenetik aktarımın ve bağışıklık sistemindeki etkileşimlerin belirlenmesi açısından da son derece önemlidir.

2.5. *Galleria mellonella*

Büyük balmumu güvesi *G. mellonella* dünya çapında bal arısı kolonilerini, kovan ürünlerini ve depolanmış petekleri istila eden, saldıran ve zarar veren bir türdür. Bu türün larvaları bal, polen ve balmumu ile beslenmek için peteklerin içinden tünel kazarak geçer ve arkalarında ağ bırakırlar. Özellikle sıcak bölgelerde zayıflamış veya ihmal edilmiş kovanlarda ve depolanmış peteklerde ciddi hasara neden olabilirler (Kwadha ve diğ., 2017). Konak *G. mellonella* türleri için kararmış peteğin besin kalitesi açısından koyu sarımsıdan daha etkili olduğu ve saf peteğin beslenme yetersizliğine neden olduğu bildirilmiştir (Uçkan ve Ergin, 2002). *G. mellonella*'nın sistematikteki yeri aşağıdaki şekildedir;

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Lepidoptera

Üstfamilya: Pyraloidea

Familya: Pyralidae

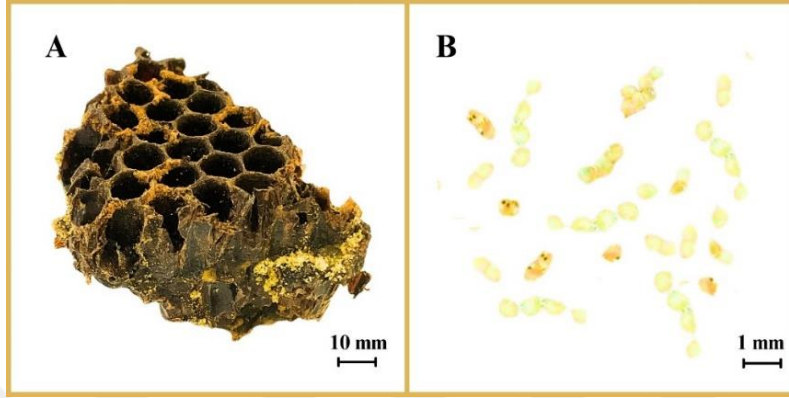
Altfamilya: Galleriinae

Cins: *Galleria* Fabricius, 1798

Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)

Büyük balmumu güvesi Holometabol bir böcek olup yumurta, larva, pupa ve yetişkin olmak üzere dört farklı yaşam evresi ile gelişimini sürdürmektedir (Kwadha ve diğ., 2017).

Yumurta: Balmumu güvesi yumurtalarının boyutları değişir, ortalama uzunluk ve genişlikleri sırasıyla 0,478 mm ve 0,394 mm'dir. Pürüzlü bir doku veren aralıklı dalgalı çizgilerle küresel bir şekle sahiptir ve rengi pembeden krem rengine, beyaza kadar değişmektedir (Şekil 2.10.A-2.10.B; Ellis ve diğ., 2013).



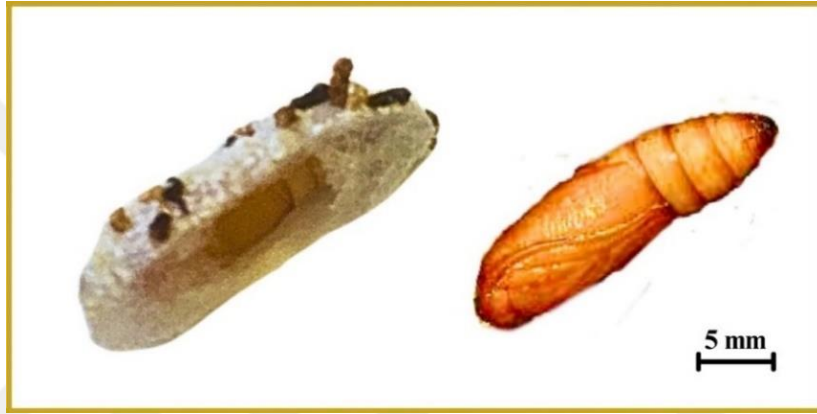
Şekil 2.10. *Galleria mellonella* yumurtalarının morfolojik görüntüsü, (A) 10 mm'de görüntüsü ve (B) 1 mm'de görüntüsü

Larva: Yumurtadan çıktıktan sonra yaklaşık 1-3 mm uzunluğunda ve 0,12-0,15 mm çapındadır (Smith, 1965). Son evre larvalar yaklaşık 25-30 mm uzunluğunda ve 5-7 mm çapındadır. Larva aşamasında, cinsiyete özgü dış morfolojik karakterlerin yokluğu nedeniyle cinsiyetlendirme yapılamaz. Toraks üzerinde altı bacak ve üçüncü ila altıncı abdominal segmentler üzerinde bir dizi proleg bulunur (Şekil 2.11). Larva sklerotize vücut parçaları ile krem rengindedir, ancak her başarılı deri değiştirme ile büyüdükçe koyulaşır. Baş, iyi gelişmiş üç apikal dişten oluşur ancak sub-apikal dişlerden yoksundur (Smith, 1965; Kwadha ve diğ., 2017).



Şekil 2.11. *Galleria mellonella* larvalarının morfolojik görüntüsü

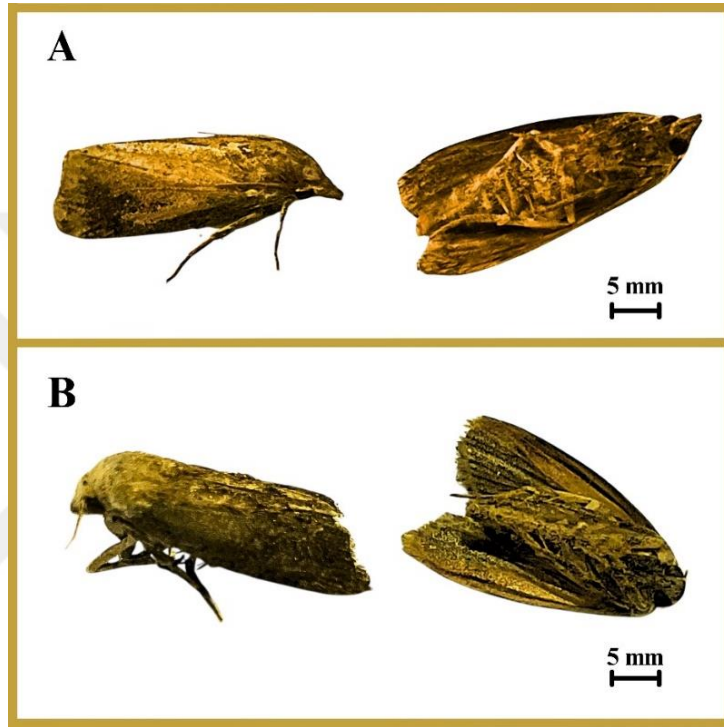
Pupa: Ortalama 12-20 mm uzunluğunda ve 5-7 mm çapındadır. Dişi pupalar normalde erkeklerden daha uzundur. Pupa oluşumunun başlangıcında, beyazdan sarıya kadar değişen renkte olan pupa, yaş ve gelişimle birlikte yavaş yavaş kahverengiye ve daha sonra koyu kahverengiye dönüşür. Ergin evrede olduğu gibi pupada da eşeysel dimorfizm mevcuttur. Dişi pupa, sekizinci abdominal segmentinde kıvrımlı bir sternuma sahiptir (Smith, 1965), erkekte ise bu yoktur, bunun yerine dokuzuncu abdominal segmentin ventral tarafında fallomerleri temsil eden küçük bir çift dış yuvarlak topuz bulunur. Pupa bir çift belirgin göze sahiptir ve antenler mezowing içine aşılانmıştır (Şekil 2.12; Smith, 1965; Ellis ve diğ., 2013; Kwadha ve diğ., 2017).



Şekil 2.12. *Galleria mellonella* pupalarının kozalı ve kozasız morfolojik görüntüsü

Yetişkin: Belirgin eşeysel dimorfizm sergilerler. Dişi balmumu güvesinin vücut uzunluğu ortalama 15-20 mm, kanat açıklığı 31 mm ve ağırlığı 169 mg'dır (Şekil 2.13; Ellis ve diğ., 2013). Erkek, dişilere kıyasla oldukça küçük ve daha az koyu renklidir. Dişi güve, erkeklerin kenarındaki taraklı (çentikli) kanat kenarının aksine neredeyse düz bir distal ön kanat kenarına sahiptir (Şekil 2.13). Ayrıca dişide ağız parçalarına gaga benzeri bir görünüm (sivri burun) veren öne doğru çıkıntılı bir labial palp bulunur, oysa erkeklerde keskin bir şekilde yukarı doğru kıvrılır ve içe doğru kancalanır (Smith, 1965). Hem erkekler hem de dişiler aynı anten tipine sahiptir, ipliksi, ancak segment sayısı (erkeklerde 40-50 ve dişilerde 50-60) bakımından farklılık gösterir (Leyrer ve Monroe, 1973). Büyük balmumu güvesi coxa, trochanter, femur, tibia, tarsus ve pre-tarsus'tan oluşan altı parçalı tipik bir Lepidopteran bacağına sahiptir (Smith, 1965; Kwadha ve diğ., 2017).

Güvenin yaşam döngüsünü tamamlaması için geçen süre haftalar ile aylar arasında değişir ve hem biyotik (tür içi ve türler arası) hem de abiyotik faktörlerden etkilenir (Gulati ve Kaushik, 2004; Kwadha ve diğ., 2017). Tür içi biyotik faktörler besin rekabeti ve kanibalizm, türler arası biyotik faktörler ise parazitoidler, bal arıları ve küçük kovan böcekleridir. Gelişim için optimum sıcaklık 29-33 °C, uygun nem aralıkları ise %29-33'dür (Kwadha ve diğ., 2017).



Şekil 2.13. *Galleria mellonella* (A) dişi ve (B) erkek yetişkinlerin morfolojik görüntüsü

Bir Lepidopter türü olan *G. mellonella* larvalarının hücrel ve humoral bağışıklık yanıtı yapısal ve fonksiyonel olarak memelilerin doğuştan gelen bağışıklık yanıtına benzemektedir (Fallon ve diğ., 2011; Browne ve diğ., 2013; Tsai ve diğ., 2016; Rossoni ve diğ., 2017; Six ve diğ., 2019). Pek çok patojenin virülans belirleyici faktörlerinin *G. mellonella* ve memelilerde benzer olması çalışmalarda en önemli noktadır (Tsai ve diğ., 2016; Six ve diğ., 2019). *G. mellonella* larva modeli, memelilerin kullanımına göre birçok avantaj sağlamaktadır (Yucel ve Kayış, 2019). Bu model organizma kullanımı, maliyet bakımından son derece uygun ve zaman bakımından hızlı yetiştirilmesi nedeniyle etik kurallara da uygundur (Cook ve McArthur, 2013; Tsai ve diğ., 2016; Wojda, 2017; Kaya ve diğ., 2021). *G. mellonella* larvaları pek çok özelliği sebebiyle

insan patojen çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Altıncicek ve diğ., 2008). *G. mellonella* larva modelinin uygun boyutu ve hemolenfin analiz için kolayca ekstrakte edilebilmesi nedeniyle yarılanma suresi, protein bağlanmasının belirlenmesi ve biyoyararlılık belirlenebilir (Altıncicek ve diğ., 2008; Desbois ve Coote, 2012). Bununla birlikte antibiyotik gibi ilaçların antimikrobiyal özelliklerini araştırmak için *G. mellonella* kullanılmaktadır (Kavanagh ve Fallon, 2010; Maguire ve diğ., 2016). Enfeksiyon çalışmalarında antibiyotik uygulamasının ve konak savunmasının gözlenmesine olanak sağlar (Aperis ve diğ., 2007; Seed ve Dennis, 2008). Larvanın boyutu (12-20 mm) hemolenf elde etmek ve analiz etmek için uygundur. Ayrıca 37  C’de retilibildikleri için insan vücut sıcaklığı ile benzerdir. Bu sıcaklığın altında ya da üzerinde transkriptomik anlamlı şekilde değişebileceği için genetik çalışmalar bakımından önemli bir model oluştırmaktadır (Rossoni ve diğ., 2017). Ayrıca konak böcekte epigenetik değişikliklerin aktarımını incelemek için güçlü bir model olarak ortaya çıkmıştır (Mukherjee ve diğ., 2015; Mukherjee ve diğ., 2019; zbek ve diğ., 2020).

Yakın zamanda Coleoptera ve Lepidoptera takımlarındaki yapılan birkaç araştırma, *G. mellonella* larvalarının da balmumu ve petrolden türetilen plastikleri biyolojik olarak paralayabildiğini ortaya koymuştur, hatta bu larvalar “plastivorlar” olarak tanımlanmıştır (Lou ve diğ., 2020; Kong ve diğ., 2019; Cassone ve diğ., 2020; LeMoine ve diğ., 2020). Araştırmaların çoğu degradasyon sürecini hızlandırmaya veya plastik kirliliğinin çevresel etkisini en aza indirmeye odaklanmıştır (LeMoine ve diğ., 2020). Biyolojik degradasyon sürecinde *G. mellonella*’nın önemli bir rol oynadığı görülse de larvaların sağkalım oranlarının düştüğü gözlenmiştir (Lou ve diğ., 2020). *G. mellonella*’nın balmumu ve plastik moleküllerini degrade edebilmesi çok fazla ilgi görürken, bu ayırt edici özelliklerin epigenetik ve bağışıklık temeli henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Demirtürk ve diğ., 2023).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Konak Stok Kültür

Konak *G. mellonella* Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı'nda 25 ± 5 °C, 60 ± 5 nem (RH), 24 saat karanlıkta yetiştirildi (Şekil 3.1). Konak stok kültürünü laboratuvarıda sürdürmek için, *G. mellonella* yetiştikleri (3♀+3♂) 2 g siyah bal peteği ile doldurulmuş 1 L'lik kavanozlara yerleştirildi ve yumurta bırakmalarına olanak sağlandı. Yumurtlamadan sonraki beşinci günde, yetiştikleri kavanozlardan çıkarıldı. Yumurtadan çıkan larvalar, Sak ve diğerleri (2006) tarafından modifiye edilen Bronskill (1961) yöntemine göre yetiştik hale gelene kadar sentetik bir diyetle beslendi. Sentetik diyet parçalanmış bal peteği, kepek, bal, gliserin ve distile su ile hazırlandı. Son evre larvaları katlanmış teksir kağıtları yerleştirilen 1 L'lik kavanozlara alınarak puplaşmaları sağlandı.



Şekil 3.1. Laboratuvarıda yetiştirilen stok *Galleria mellonella*'nın tüm yaşam evreleri

3.2. Alüminyum Oksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

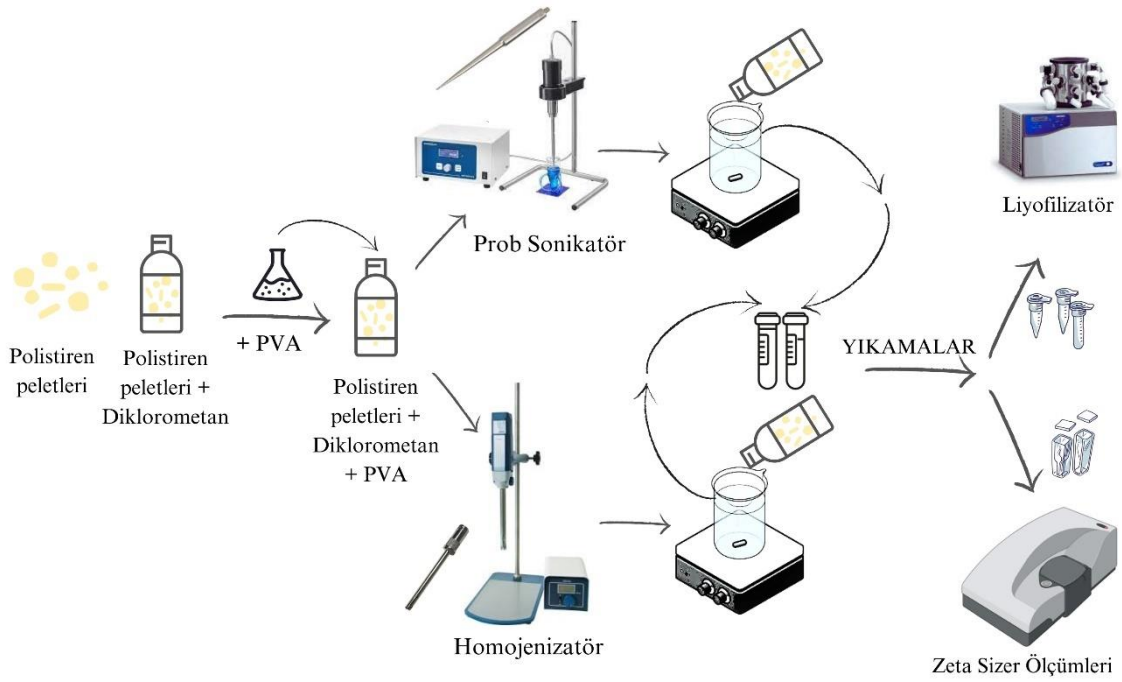
Parçacık boyutu <50 nm ve polidispersite indeksi (PDI) yaklaşık 0,1 olan küresel Al_2O_3 NP'ler Sigma Aldrich®'den temin edildi. Al_2O_3 NP'lerin zeta (ζ) potansiyelleri ve boyut

dağılımı Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern) kullanılarak 25 °C’de dinamik ışık saçılması yöntemiyle (DLS) ölçüldü. Al₂O₃ NP’lerin yüzey morfolojisi Sakarya Üniversitesi Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (SARGEM) Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile belirlendi.

3.3. Polistiren Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

PS NP’ler Kocaeli Üniversitesi Kimya Bölümü Polimer ve Malzeme Araştırma Laboratuvarı’nda tekli emülsiyon yöntemi uygulanarak hazırlandı. PS NP’lerin boyutunu optimize etmek için sonikasyon ve homojenizatör ayrı ayrı kullanılarak bunların süresi ve gücü gibi parametreler değiştirilerek tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma (W/O) yöntemine göre çeşitli denemeler yapıldı (Akagi ve diğ., 2012, Kızisar ve diğ., 2016, Kirik ve Kızılbey 2019). Bu amaçla öncelikle PS peletleri (Molekül ağırlığı: 35,000 g/L, yoğunluk; 25 °C’de 1,06 g/mL) 20 ve 25 mg olarak ayrı ayrı tartıldı ve 2 mL diklorometan içinde çözüldü. Daha sonra yüzey aktif madde olarak 4 mL %0,75’lik poli (vinil alkol) (PVA) eklendi ve su içinde yağ emülsiyonu (o/w) oluşturmak üzere emülsifiye edildi. Karışım bir dk boyunca karıştırıldıktan hemen sonra sonikasyon işlemi uygulandı. Bir prob sonikatör (Bandelin Sonopuls HD 2070.2) ile 4 dk boyunca saniyede bir %35 güçle sonike edildi. Emülsiyon 35 mL %0,75’lik PVA çözeltisi içine aktarıldı. Karışımındaki organik çözücü çeker ocak içerisinde 3 saat boyunca 1,000 rpm’de karıştırıldı ve buharlaştırma yoluyla uzaklaştırıldı. Kararlı bir emülsiyon oluşturduktan sonra partiküller 12,000 rpm’de santrifüj edildi (Gyrozen 1580R, Seul, Kore) ve iki kez distile su ile yıkandı (Şekil 3.2).

Prob sonikatör yerine bir homojenizatör (Daihan Scientific homojenizatör HG-15D) ile tekli emülsiyon yöntemi uygulandı. Kısaca; ayrı ayrı tartılan 20 ve 25 mg PS 2 mL diklorometan içinde çözüldü ve üzerine 4 mL %0,75’lik PVA eklenerek oluşan karışım bir dk boyunca karıştırıldı. Homojenizasyon işlemi 8 dk boyunca 2,700 rpm’de gerçekleştirildi. Emülsiyon 35 mL %0,75’lik PVA çözeltisi içine aktarılarak organik çözücü 1,000 rpm’de 3 saat boyunca karıştırıldı ve buharlaştırmayla uzaklaştırıldı. Kararlı bir emülsiyon oluşturduktan sonra partiküller 12,000 rpm’de santrifüj edildi ve iki kez yıkandı (Şekil 3.2; Demirtürk ve diğ., 2023).



Şekil 3.2. Polistiren nanopartiküllerinin üretiminde uygulanan aşamalar. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

PS NP üretiminde yıkama aşamaları sonunda toplanan sulu partiküllerden suyun uzaklaştırılması $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $0,008\text{ mBar}$ basınçta bir liyofilizatör (Labconco FreeZone Plus Cascade Freeze Dry Systems 2,5 L) ile gerçekleştirildi. Bu sırada bir hassas terazi ile ependorf tüplerinin ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Daha sonra sulu partiküller, ağırlıkları kaydedilen ependorf tüpleri içerisine aktarıldı, kurutma kağıtları ile kapatıldı ve liyofilizatöre kondu. Liyofilizatör işleminden sonra içerisinde suyu uzaklaştırılmış partiküller ve tüpün ağırlığı kaydedildi. Partiküllerin ağırlığı ependorf tüplerinin ağırlıklarının çıkarılması sonucu tespit edildi. Elde edilen PS NP'lerin toplanma verimi bu şekilde hesaplandı. Ayrıca boyut dağılımı (Z-ortalama çapları), PDI ve zeta potansiyelleri Zetasizer Nano ZS 90 kullanılarak $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dinamik ışık saçılma yöntemiyle ölçüldü. PS NP yüzey morfolojisi SARGEM'de SEM ile belirlendi.

3.4. Letal Konsantrasyon 50 (LC₅₀) Değerleri

Al₂O₃ ve PS NP'lerin ortalama ölümcül konsantrasyonunu (LC₅₀; bir deney grubunu oluşturan böcek popülasyonunun %50'sini öldürmek için yeterli olan bileşen

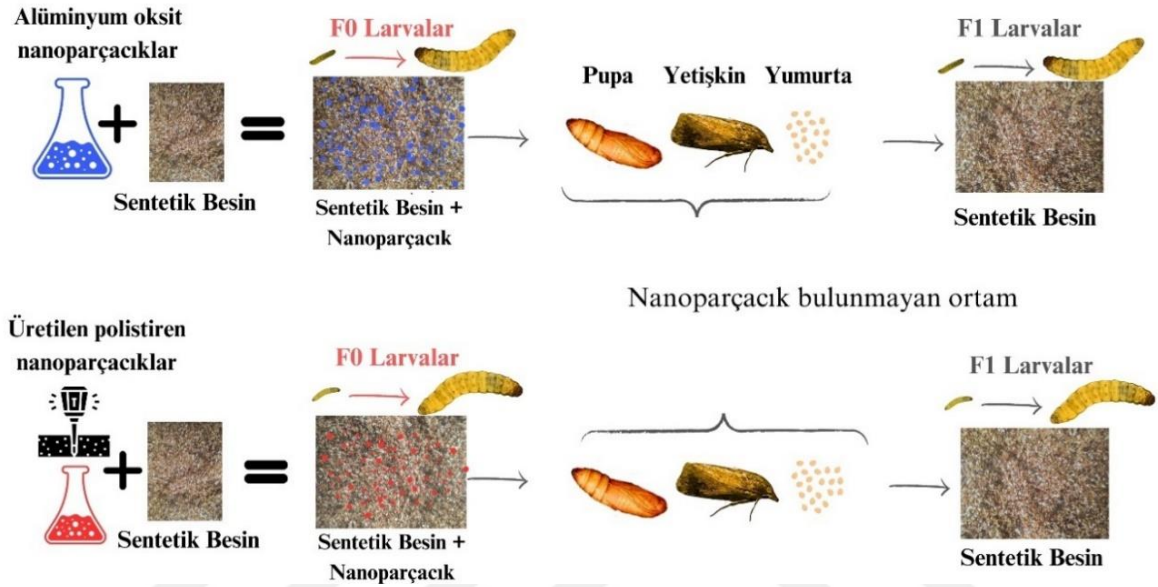
konsantrasyonu) belirlemek için, düşük konsantrasyonlardan yüksek konsantrasyonlara (10, 50, 100, 200, 500, 1000 ve 3000 ppm) doğru ilerleyen birçok doz denemesi yapıldı (Şekil 3.3). Bu konsantrasyonlar için ayrı ayrı tartılan Al_2O_3 ve PS NP'ler distile suda süspanse edildi ve sentetik bir besin hazırlandı. Çeşitli konsantrasyonlarda distile su ile hazırlanan Al_2O_3 ve PS NP'ler ultrasonik banyoda (ISOLAB) 40 şiddetinde 10 dk karıştırıldı. Ardından hazırlanan Al_2O_3 ve PS NP çözeltileri Sak ve diğerleri (2006) tarafından optimize edilen sentetik besini oluşturan distile su miktarının yerine kullanıldı. Kontrol grubu larvalarına herhangi bir NP solüsyonu eklenmeden sadece distile su ile hazırlanan sentetik besin verildi. Probit analizi için her grupta altı ayrı kavanozda ve her kavanozda beş larva olacak şekilde farklı nesillerden toplam 30 larva kullanıldı. On farklı grup için 300 farklı larva kullanıldı. Beş birinci evre larva bir kavanoza yerleştirildi ve larva başına 2 g olacak şekilde günde 10 g sentetik diyet verildi. Al_2O_3 ve PS NP'lerle hazırlanan diyetler *G. mellonella*'ya birinci evre larvadan son evre larva (0,19 – 0,22 g) oluncaya kadar (yaklaşık 25 gün) uygulandı. Probit analizinde kullanılmak üzere, 25. günde ölü larva ve canlı larva sayısı sayıldı. Ölü larva sayısı hesaplandı ve LC_{50} değerleri IBM SPSS Statistics version 27, Probit Analysis programı kullanılarak %95 güven seviyeleri ile belirlendi (Finney, 1971). Al_2O_3 ve PS NP'lere maruz bırakılarak yetiştirilen larvalar tüm analizlerde kullanıldı.



Şekil 3.3. Probit analizi için oluşturulan deney gruplarına ait örnekler

Epigenetik mekanizmalar arasında yer alan global DNA metilasyonu ve hümmoral bağışıklık tepkilerinde önemli AMP'lerin gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için yapılan analizler iki nesilde gerçekleştirildi. Bunun için ilk (ebeveyn; F0) nesil *G.*

mellonella larvaları ilk evreden son evreye kadar ortalama 25 gün ayrı ayrı Al_2O_3 ve PS NP içeren sentetik besinle beslendi. Ardından pupa, yetişkin ve yumurta formlarını takiben ikinci nesil (yavru; F1) larvaların oluşması beklendi. Bu süreçte herhangi bir nanoparçacık uygulaması yapılmadı. F1 larvalar son evreye gelinceye kadar normal nanoparçacık içermeyen diyetle beslendi (Şekil 3.4) ve analizler gerçekleştirildi.



Şekil 3.4. Birinci ve İkinci nesil *Galleria mellonella* larvalarının beslenme ve gelişim şekli. F0: Birinci nesil, F1: İkinci nesil, Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

3.5. DNA Metilasyonu

3.5.1. DNA İzolasyonu

Deneylerde Al_2O_3 ve PS NP uygulaması yapılan 190-220 mg arasındaki son evre larvalar kullanıldı. Bununla birlikte aynı boyutlara sahip ve larval dönemi süresince hiçbir NP uygulaması yapılmayan ikinci nesil larvalar da epigenetik aktarım (DNA metilasyonu) analizi için kullanıldı.

Ayrıçalar:

- RNaz böcek liziz tamponu (10 mmol/L Tris-HCl pH:8,00, 100 mmol/L EDTA pH:8,00, %0,5 SDS)
- 10 mmol/L Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür (Tris-HCl): İlk olarak 1 M'lık Tris-HCl hazırlandı. Bu amaçla 12,11 g Tris baz tartıldı ve 80 mL distile su

(dH₂O) ile tamamlandı. Pipetle yavaşça hidroklorik asit (HCl) eklenerek pH: 8,0 olacak şekilde pH metre (METTLER TOLEDO SevenMulti) ile ayarlanarak 100 mL'ye dH₂O ile tamamlandı. Daha sonra 100 kez dilüe edilerek 100 mL, 0,01 M Tris-HCl elde edildi.

- 100 mmol/L Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA); 100 mL'lik solüsyon için 3,72 g EDTA tartıldı.
- %0,5 sodyum dodesil sülfat (SDS); 100 mL'lik solüsyon için 0,5 g SDS tartıldı.
- Bu üç bileşen karıştırılarak pH: 8,0 olması için pH metre ile kontrol edildi ve amber şişeye alındı.
- Tamponlanmış Fenol: Donmuş fenol 50 °C sıcaklıktaki sıcak su banyosunda çözündürülerek bir amber şişe içerisine 50 mL alındı. Üzerine 50 mM Tris-HCl (pH: 8,0) tamponundan eklenerek oda sıcaklığında bir manyetik karıştırıcıda (IKA® RCT Basic safety control) 30 dk karıştırıldı. Karışım sıcak su banyosuna alınarak fazlara ayrılması için yaklaşık 30 dk beklendi ve üst kısımda oluşan sıvı faz uzaklaştırıldı. Sıvı faz pH: 7,8'e gelinceye kadar bu işlem 4- 5 kez tekrarlandı. Son aşamada fenolün üzerine 20 mL 0,1 M Tris-HCl (pH: 8,0) eklenerek 4 °C'de saklandı.
- Fenol / klorofom / izoamil alkol (25: 24: 1): 50 mL tamponlanmış fenol, 48 mL klorofom ve 2 mL izoamil alkol karıştırılarak hazırlandı.
- Kloroform / izoamil alkol (24: 1): 96 mL kloroform ve 4 mL izoamil alkol karıştırıldı.
- 3M Sodyum asetat (NaOAc / CH₃COONa): 24,91 g tartılıp 100 mL'ye dH₂O ile tamamlandı.
- Tris EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA): 0,0372 g EDTA tartılarak 10 mmol/L Tris-HCl tamponu ile 100 mL'lik pH: 8,0 olacak şekilde bir solüsyon hazırlandı.

Tüm larvalar ayrı ayrı sıvı azotta ezilip toz haline getirildikten sonra Chen ve diğerlerinin (2008b) uyguladığı metoda göre DNA izolasyonu yapıldı. Bu metoda göre toz haline getirilen larvalar ile RNaz böcek liziz tamponu (10 mmol/L Tris-HCl pH:8,00, 100 mmol/L EDTA pH:8,00, %0,5 SDS) (W/V, 1: 5) ile bir eppendorf tüp içerisinde karıştırıldı. Hazırlanan tüpler ısıtıcı çalkalayıcı blok (Eppendorf Thermomixer Compact) içerisine yerleştirilerek 90 dk 37 °C'de (300 rpm) inkübe edildi. Daha sonra aynı koşullar altında üzerine 100 µg proteinaz K eklenip bir gece 55 °C'de inkübe

edildi. Ardından sırası ile fenol, fenol/ kloroform/ izoamil alkol (25: 24: 1), kloroform/izoamil alkol (24: 1) ile 13,000 rpm'de 10 dk santrifüj ile ekstrakte edildi. Bu basamaktan sonra 1/10 hacim 3M NaOAC ve 2 hacim %100'lük etanol ile DNA'yı çöktürmek üzere -20 °C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün 13,000 rpm'de 30 dk 4 °C'de santrifüj edilerek DNA peleti elde edildi. Buradan elde edilen pelet önce %70'lik ardından %100'lük etanol ile yıkanıp kurutuldu ve 100 µL TE tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) içerisinde çözdürüldü (Chen ve diğ., 2008b). Elde edilen DNA'nın saflık dereceleri ve konsantrasyonları öncelikle BMG LABTECH L-Vis Plate (SPECTROstar Nano) ile ölçüldü, ardından %1'lik (W/V) agaroz jel elektroforezi ile DNA'lar yürütülerek kontrol edildi. DNA saflık dereceleri incelenirken $A_{260/230}$ değerlerinin 2,0-2,2 ve $A_{260/280}$ değerlerinin ise 1,8-2,0 arasında olmasına dikkat edildi. Bu şekilde ilk ve ikinci nesil larvadan elde edilen DNA'lar global metilasyon belirleme deneylerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı. Analizlerde her deney grubundan toplam 10 birey kullanıldı.

3.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Ayırıcılar:

- %1'lik agaroz jel: 0,5 g agaroz tartıldı ve 50 mL dH₂O ile tamamlandı.
- 100X Tris Asetat EDTA

DNA'nın görüntülenmesi için öncelikle %1'lik agaroz (Biomax, Prona) jel hazırlandı. Elektroforez tankının büyüklüğü göz önüne alınarak 50 mL olacak şekilde 0,5 g agaroz tartıldı ve mikrodalga fırında (Arçelik MD 574) ısıtıldı. Agaroz jelin soğuması ve DNA'nın görünmesini sağlayan 1 µL Etidyum bromür, ısıtılan agarozun içerisine eklendi. Bu sırada tank içerisine tarak yerleştirilerek hazırlanan agaroz jel tank içerisine döküldü. Jel tamamen donduktan sonra tarak çıkarılarak oluşan kuyucukların katot kısmında kalmasına dikkat ederek jel yerleştirildi. Tankın içi jelin üzerine çıkacak şekilde 100X TAE Buffer (Tris Asetat EDTA, BioFroxx, Almanya) ile dolduruldu. İşlemden önce DNA örnekleri tarak dişlileri ile oluşturulan yuvalara kondu. DNA'lar kuyucuklara yüklenerek 100 Volt akımda 50 dk süresince elektroforezde (Cleaver Scientific LTD., CS 300V) yürütüldü. DNA içerdiği fosfat grubu nedeniyle negatif yüklü ve pH: 5,0-7,0 arasındadır. Akımın etkisi sonucu DNA molekülleri katotdan

anoda doğru hareket eder. Agaroz jel içerisinde bulunan etidyum bromür UV ışınları altında DNA'ya floresans özellik kazandırarak jel içerisinde DNA'yı görünürlük kazandırır. Elektroforez işlemi biter bitmez jel UV ışığı ile aydınlatıldı ve DNA'lar fotoğraflandı.

3.5.3. Global DNA Metilasyonu

Ayırıcılar:

- 50 mM amonyum ortofosfat (pH 4,1)
- 50 mM ortofosforik asit (H_3PO_4 ; Merck, Almanya): 3,33 mL H_3PO_4 ile 996,66 mL d H_2O karıştırılarak hazırlandı.
- 50 mM diamonyum ortofosfat (Sigma Aldrich, Almanya): 6,60 g tartılarak 1000 mL'ye 50 mM H_3PO_4 ile tamamlandı.
- Hazırlanan ayırıcının pH'ı 1 M'lık H_3PO_4 ile 4,1'e ayarlandı.
- 2'-desoksi-5-metilsitidin-3'-monofosfat (5m-dCMP): Farklı konsantrasyonlarda 5m-dCMP hazırlandı. Hazırlanan 5m-dCMP standartları Tablo 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.1. Global DNA metilasyonunda 5m-dCMP standart eğri konsantrasyonları

5m-dCMP standart konsantrasyonları (ng)	dH ₂ O hacmi (µl)
3200	20
1600	20
800	20
400	20
200	20
100	20
50	20
20	20
10	20

İzolasyon sonucu elde edilen son evre larvalarından ve ikinci nesil larvalardan elde edilen yüksek kaliteli DNA'lar (her bir larva için reaksiyon başına 1000 ng), DNA Degradaz Plus™ (Zymo Research) ile nükleotitlerine hidrolize edildi. Bunun için Tablo 3.2'de belirtilen bileşenler hazırlandı ve 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. Daha sonra enzimi inaktive etmek üzere 70 °C'de 20 dk inkübasyon gerçekleştirildi. Tüm nükleotitlerine ayrılmış DNA örnekleri Perkin Elmer P200 yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazına enjeksiyondan önce 5 dk 6000 rpm'de 0,2 µm'lik bir Corning Costar Spin-X santrifüj tüpü filtresinden geçirilerek homojen hale getirildi. Reaksiyon ürününün 2 µL'si %1'lik agaroz jelde 40 dk 100V'da yürütülerek tüm DNA'nın parçalanıp parçalanmadığı kontrol edildi. Geriye kalan reaksiyon ürünü HPLC cihazında global metilasyon ölçümü yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.2. DNA nükleotitlerinin hidrolizi için hazırlanan bileşenler

DNA'nın nükleotitlerine hidrolize edilmesi için hazırlanan bileşenler	Hacim (µL)
DNA nükleotitleri (1000 ng/µL)	2
10X DNA Degredaz™ Reaksiyon Tamponu	2,5
DNA Degredaz Plus™ (5 U/µL)	1
Nükleaz içermeyen su	19,5
Toplam hacim	25

HPLC analizi Perkin Elmer P200 cihazında ACE 5 C8 (125 × 4 mm) kolonu kullanılarak yapıldı (Ramsahoye, 2002). Mobil faz olan 50 mM amonyum ortofosfat (pH: 4,1) filtre edildi (0,2 µm) ve HPLC kolonunun kullanımdan önce tamamen gazı giderildi. Her reaksiyon için, 280 nm'de 0,75 mL/dk akış hızında 20 µL hacimde 1000 ng DNA nükleotitleri enjekte edildi. HPLC yazılımı olarak TotalChrom Navigator/TCNAV kullanıldı.

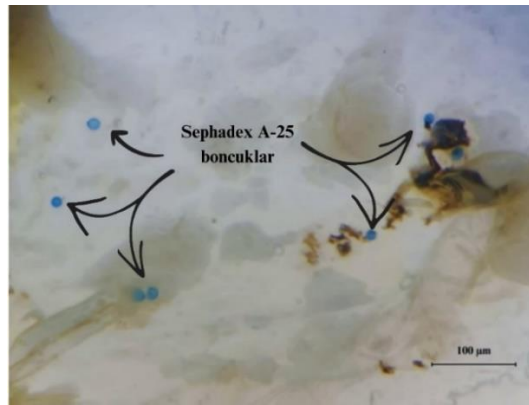
Örnekler çalışılmadan önce global DNA metilasyon konsantrasyonlarını belirlemek ve kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla 5m-dCMP standartları Tablo 3.1'de gösterildiği şekilde hazırlandı. Örneklerde gerçekleştirilen işlemler uygulanarak 5m-dCMP

standartlarının HPLC cihazında oluşturduğu piklerin alıkonma zamanı ve farklı konsantrasyonlara ait piklerin büyüklüğü belirlenerek optimizasyon gerçekleştirildi. Dokuz farklı konsantrasyonda hazırlanan 5m-dCMP standartlarının oluşturduğu piklerin alanları ile standart eğri oluşturuldu. Örneklerin oluşturduğu piklerin alanları, standart eğrinin konsantrasyonları ile karşılaştırılarak hesaplandı. Özetle global DNA metilasyon seviyesi, 280 nm’de saptanan 1 µg genomik DNA’daki 5m-dCMP miktarı (ng) olarak hesaplandı. Analizler her bir grupta 10 larva olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.6. Bağışıklık Sistemi

3.6.1. Enkapsülasyon

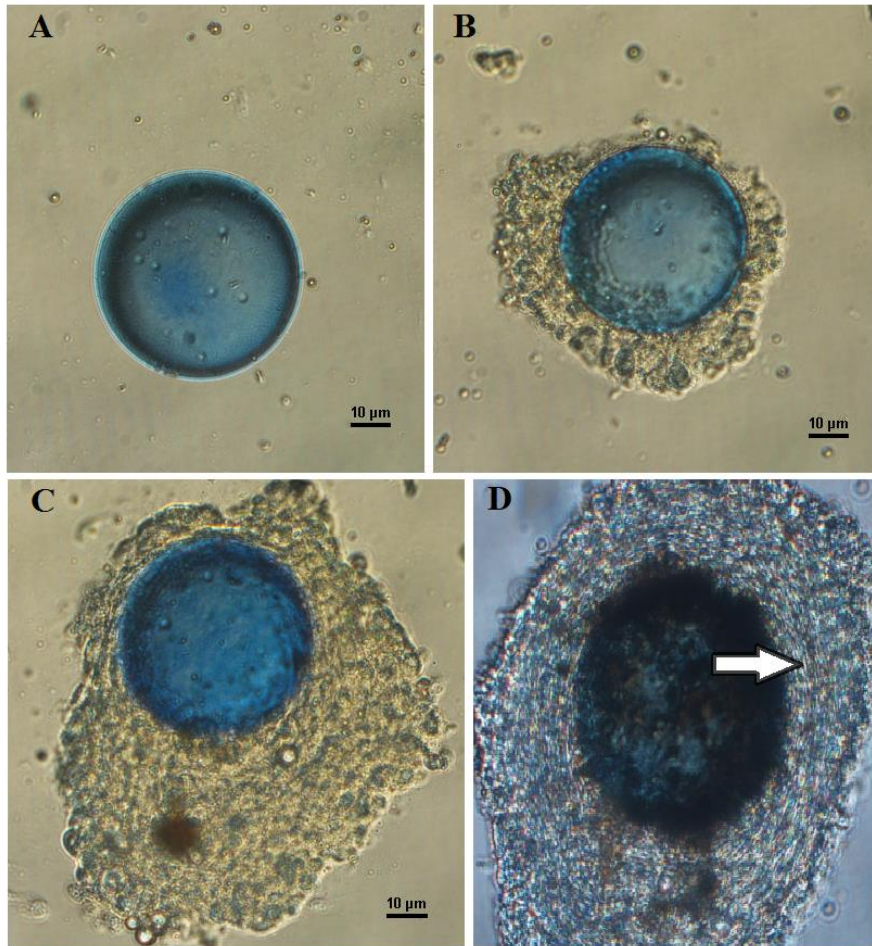
Enkapsülasyon analizleri için Sephadex A-25 boncukları (40- 120 µm çapında; Sigma Aldrich, Almanya) uygulandı. Bu boncuklar %1’lik Coomassie Brilliant Blue G ile boyandıktan sonra üç kez Fosfat Tamponlu Salin (PBS, pH 7,4) ile yıkandı. Daha sonra boncuklar bir lam üzerindeki bir damla PBS içerisine aktarıldı (Richards ve Dani, 2008). Ortalama 15-25 boncuk (bir larva için) içeren 10 µL PBS, stereomikroskop (Olympus SZ7, Japonya) altında 22 gauge, 50 µL Hamilton mikroenjektör (Hamilton Co., Reno, NV. ABD) içine toplandı. Toplanan boncuklar larvaların ilk abdominal ön bacaklarının ön segmentinden vücuda enjekte edildi. Boncuk enjekte edilen larvalar bir petri kabına yerleştirildi, ardından kültür odasına alındı ve 4 saat sonra stereomikroskop altında disekte edildi (Şekil 3.5). Benzer şekilde boncuk enjekte edilen diğer larvalar bir petri kabına yerleştirildikten sonra kültür odasına götürüldü ve 24 saat sonra disekte edildi (Uçkan ve diğ., 2010).



Şekil 3.5. Boncuk enjeksiyonunun 4. ve 24. saatin sonunda disekte edilen larvalarda gözlenen boncukların görüntüsü (Olympus Stereo Microscop 30X büyütme – 100 µm)

Kontrol ve bütün deney gruplarında gerçekleştirilen bu işlemin 4. ve 24. saatler sonunda tüm boncuklar üzerinde bir damla PBS bulunan bir mikroskop lamı üzerine toplandı. Faz kontrast mikroskobu (Nikon Ti-U 10X, Tokyo, Japonya) ile toplanan boncuklar görüntüldü. Analizlerde grup başına 5 larva kullanıldı ve 3 kez tekrarlandı. Her grup için toplam 15 larva kullanıldı.

Enkapsülasyon tepkisi Richards ve Dani'nin (2008) kriterlerine göre değerlendirildi (Şekil 3.6; Demirtürk ve diğ., 2023). Buna göre, boncuklara bağlı sadece birkaç hemosit veya bağlanmamış hemosit varsa enkapsülasyon olmayan tepki (Şekil 3.6.A), boncukların etrafında 2-10 hemosit kümesi varsa zayıf enkapsülasyon (Şekil 3.6.B) ve boncukların etrafında 10'dan fazla hemosit kümesi varsa güçlü enkapsülasyon (Şekil 3.6.C-3.6.D) tepkisi olarak sınıflandırıldı.

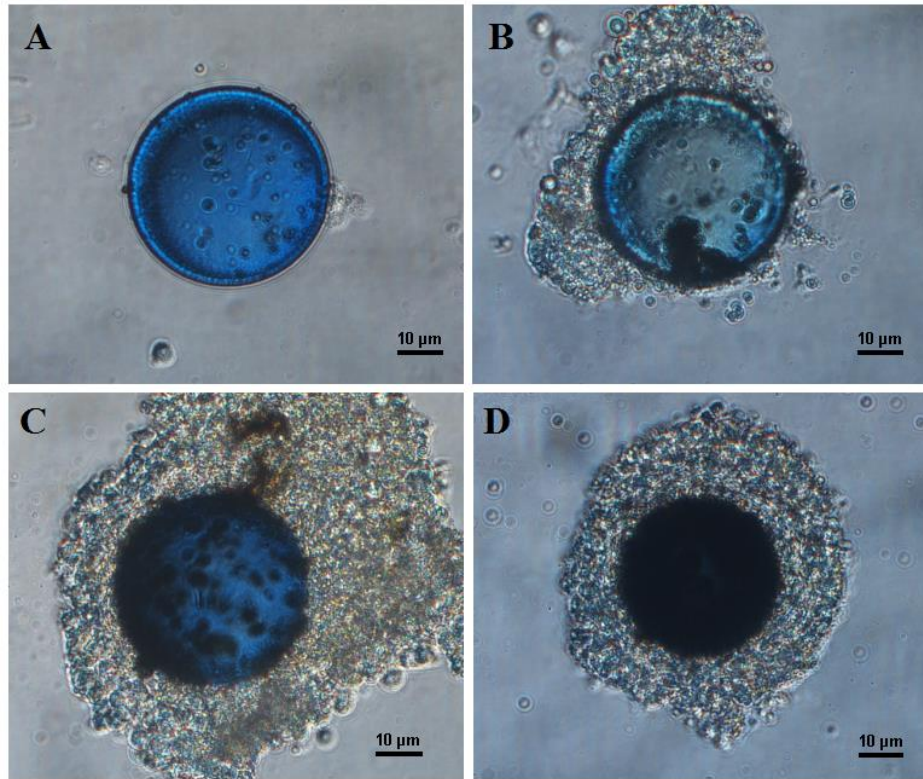


Şekil 3.6. PBS ile birlikte enjekte edilen Sephadex A-25 boncuklarının *Galleria mellonella* larvaları tarafından *in vivo* enkapsülasyonu gösteren faz kontrast mikroskopik görüntüleri. Her bir larvaya yaklaşık 15-25 boncuk enjekte edildi ve 4-24

saat sonra larvalar disekte edilerek değerlendirildi. Larvalardan çıkarılan tüm boncuklar bu mikrograflara göre değerlendirildi, (A) enkapsüle olmamış boncuk, (B) zayıf enkapsüle olmuş boncuk, (C) güçlü bir enkapsülasyon tepkisinin oluştuğunu gösteren çok sayıda düzleşmiş ve konsantrik olarak düzenlenmiş hemosit tabakası ile çevrilidir, (D) boncuk etrafında düzleşmiş hemosit katmanlarının (ok) varlığını gösteren yüksek güçlü mikroskopik görüntü (Nikon Ti-U 10X - 10 µm)

3.6.2. Melanizasyon

Melanizasyon tepkileri, enkapsülasyon için toplanan boncukları çevreleyen hemositlerin kararma derecesinin yüzdeleri hesaplanarak elde edildi. Melanizasyon yanıtında, boncuklar dört gruba kadar kategorize edildi (Şekil 3.7; Demirtürk ve diğ., 2023). İlk grup melanize olmamış (boncuklarda melanizasyon yok) (Şekil 3.7.A), ikinci grup zayıf melanizasyon (boncukların yüzeyinde $\leq$ %20 kararma var (Şekil 3.7.B), üçüncü grup orta derecede melanizasyon (boncukların yüzeyinde %21-69 kararma var (Şekil 3.7.C) ve son grup ise güçlü melanizasyon (boncukların yüzeyinde $\geq$ %70 kararma var (Şekil 3.7.D) (Richards ve Dani, 2008, Kaya ve diğ., 2021).



Şekil 3.7. PBS ile birlikte enjekte edilen Sephadex A-25 boncuklarının *Galleria mellonella* larvaları tarafından *in vivo* melanizasyonunu gösteren faz kontrast mikroskopik görüntüleri. Her bir larvaya yaklaşık 15-25 boncuk enjekte edildi ve 4-24

saat sonra larvalar disekte edilerek değerlendirildi. Larvalardan çıkarılan tüm boncuklar bu görüntülere göre değerlendirildi. Melanizasyon tepkisi; (A) melanize olmamış boncuk, (B) zayıf melanize olmuş boncuk (bu boncukların yüzeyinde $\leq$ %20 kararma), (C) orta derecede melanize olmuş boncuk (bu boncukların yüzeyinde %21-69 kararma) ve (D) güçlü melanize boncuk (bu boncukların yüzeyinde $\geq$ %70 kararma) (Nikon Ti-U 10X - 10 μ m)

3.6.3. Fenol Oksidaz Aktivitesi

Ayırıcılar:

- %70'lik etanol
- 0,05 M PBS (pH: 7,4)
- 3,4-Dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA, Cayman Chemical Company): 30 mg/L DOPA tartıldı 10 mL distile su (dH₂O) ile tamamlandı.

Kontrol ve her bir deney grubunda gelişen son evre larvalar rastgele alındı, buz üzerinde anestezi uygulandı ve %70'lik etanol kullanılarak sterilize edildi. Hemolenf (20 μ L) bu larvaların ilk abdominal ön bacaklarının ön segmentinden steril bir iğne kullanılarak toplandı (Şekil 3.8). Toplanan hemolenf örneği soğuk zincire dikkat edilerek 180 μ L soğuk PBS içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Hemolenfin melanizasyonunu önlemek için soğuk zincir sürdürülerek analizler için kullanılana kadar -20 °C'de saklandı.



Şekil 3.8. *Galleria mellonella* hemolenfinin alındığı ilk abdominal ön bacaklarının ön segmenti. Görsel CanvaPro ile oluşturuldu

Deneyden önce çözündürülen hemolenf ve PBS karışımı 4 °C’de soğutulmuş bir santrifüjde (Beckman Coulter™ Microfuge® 22R Centrifuge, ABD) 13,000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant analizler için kullanıldı. Süpernatantın 40 µL’si bir 96 kuyucuklu bir mikrolakaya aktarıldı ve 160 µL L-DOPA substrat olarak eklendi. Absorbans, ELISA mikrolakaya okuyucuda (SPECTROstarNANO, BMG LABTECH) 490 nm’de (A_{490}) 30 dk boyunca 5 dk aralıklarla art arda ölçüldü (Brookman ve diğ., 1989, Kaya, 2020). Larvaların hemolenfindeki toplam protein seviyeleri bişikoninik asit (BCA) kullanılarak hesaplandı (Smith, 1985). Tüm analizler farklı zamanlarda farklı popülasyonlardan alınan larvalarla üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve her tekrarda 5 larva kullanıldı. Fenoloksidaz aktivitesinin birimi (U)/mg protein/dk olarak verildi ve DOPA krom oluşum hızını belirlemek için $3,56 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ Molar ekstinksiyon katsayısı kullanıldı (Brookman ve diğ., 1989; Kaya, 2020). Hesaplamalarda kullanılan denklem (3.1)’de gösterilmektedir.

$$PO = \frac{\left(\frac{\Delta_{\max} - \Delta_{\min}}{\Delta t} \right) \times V_{\text{toplaml}}}{\epsilon \times d \times V_{\text{deney}}} \quad (3.1)$$

- $\Delta_{\max}$: Maksimum absorbans
- $\Delta_{\min}$: Minimum absorbans
- Δt : Toplam süre (30 dk)
- V_{toplaml} : Toplam kuyucuk hacmi (200 µL)
- V_{deney} : Hemolenf hacmi (40 µL)
- ϵ : Ekstinksiyon katsayısı ($3,53 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- d: Işık hızı (1)

3.6.4. Protein Tayini

PO aktivitesinde kullanılan hemolenflerin protein miktarı Bişikoninik asit metodu ile belirlendi (Smith, 1985).

Ayırıcılar:

- BCA (Bicinchoninic acid solution; Sigma Aldrich, B 9643)
- %4’lük bakır sülfat (CuSO_4)

- Protein renklendirme ayıracı: 20 mL bişikoninik asit çözeltisi üzerine 0,4 mL %4'lük CuSO₄ eklenerek hazırlandı.

Bunun için BCA ve %4'lük CuSO₄ çözeltisi (50:1, V:V) karıştırılarak protein renklendirme ayıracı hazırlandı. Mikroplaka kuyucuklarına 200 µL protein renklendirme ayıracı ve üzerine 10 kez PBS ile sulandırılmış larval hemolenflerden 10 µL eklendi. Karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 30 dk beklendi. Oda ısısında soğutuldu ve oluşan rengin absorbansı 562 nm'de ELISA (SPECTROstar Nano BMG LABTECH) mikropilaya okuyucuda kör tüpe karşı okundu. Ayrıca protein standartları içeren kuyucuklar da hazırlandı ve standart eğri oluşturuldu.

3.7. Gen İfadesi Analizleri

3.7.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için farklı dozlarda Al₂O₃ ve PS NP verilen son evre larvalar öncelikle sıvı azotla dondurularak steril havanda toz haline getirildi. Daha sonra Trizol Reagent (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. 20 mg toz haline getirilen doku tartılarak üzerine 200 µL Trizol Reagent eklendi. Vorteksle hafifçe karıştırıldıktan sonra üzerine 40 µL kloroform (Sigma Aldrich, Almanya) eklenerek hafifçe elde karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek nükleoprotein yapısının tamamıyla çözülmesi sağlandı. Örnekler yüksek miktarda yağ, protein ve polisakkarit içerdiği için 10 dk 4 °C'de 13,000 rpm'de santrifüj edilerek çözünmeyen materyallerin (ekstraselüler membranlar, polisakkaritler ve yüksek moleküler ağırlıktaki DNA) altta toplanması sağlandı. Santrifüj sonrasında en altta protein içeren kırmızı-pembe renkli bir sıvı, bunun üzerinde içinde DNA'nın bulunduğu bir ara faz ve en üstte RNA'nın bulunduğu renksiz bir sıvı olmak üzere üç katman oluştu. Santrifüj sonunda üst kısımda yer alan sıvı (RNA) yeni steril ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerlerine eşit hacimde izopropil alkol (Sigma Aldrich, Almanya) eklendi. Ependorf tüplerinin kapakları kapatıldıktan sonra elde yavaşça sallanarak sıvıların karışması sağlandı ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Daha sonra tüpler 5 dk 4°C'de 13,000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan pelet üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı. RNA peleti 1 mL %75'lik etil alkol ile yıkandı ve ardından 5 dk 4°C'de 7,500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak %100'lük etil alkol ile ikinci yıkama yapıldı. Peletin

üzerindeki sıvı uzaklaştırılarak oda sıcaklığında kuruması sağlandı. Pelet kurutulduktan sonra 50 µL nükleaz içermeyen su eklendi ve RNA peletinin su içerisinde çözünmesi sağlandı. Elde edilen RNA'nın kalitesi ve miktarı BMG LABTECH L-Vis Plate ile okundu ve RNA'lar agaroz jelde yürütüldü. İzole edilmiş RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı.

3.7.2. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA'nın görüntülenmesi için uygulanan yöntem RNA görüntülenmesi için de kullanıldı. Analiz bölüm 3.5.2'de anlatılan şekilde gerçekleştirildi.

3.7.3. cDNA Sentezi

Kit (NucleoGene cDNA Synthesis Kit (5x)) talimatına uygun şekilde cDNA sentezi için 2 µg RNA olacak şekilde dilüsyon yapıldı. Ardından RNA, nükleaz içermeyen su ve 4 µL 5X cDNA sentez kiti (qScript revers transkriptaz ve stabilizatörleri, dNTP'ler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), magnezyum klorür ve rekombinant RNaz inhibitör protein) içeriği PCR tüplerinde toplam hacim 20 µL olacak şekilde hazırlandı (Tablo 3.3). cDNA'ları elde etmek için kullanılan RT-qPCR protokolü ve inkübasyon süreleri Tablo 3.4'de gösterildi. Elde edilen cDNA'lar daha sonra gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

Tablo 3.3. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Miktar (µL)
RNA *	Deneye bağlı
Nükleaz içermeyen su *	Deneye bağlı
5X cDNA sentez kiti	4
Toplam hacim	20

*RNA ve nükleaz içermeyen su karışımı, tüm örneklerde 2 µg RNA olacak şekilde dilüe ederek hazırlandı.

Tablo 3.4. cDNA sentezi için RT-PCR döngüleri

Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)
25	5
42	30
85	5
4	∞

3.7.4. RT-qPCR Analizleri

Yüksek kaliteli RNA'lerden elde edilen cDNA'lar ile spesifik gen bölgelerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Bunun için Nucleogene RT-qPCR SYBR Green Master Mix (2X) kullanıldı. Kit talimatına göre toplam hacim 20 µL olacak şekilde her bir reaksiyon için 2 µg cDNA, 1 µL forward ve reverse primer (her spesifik gen bölgesi için farklı), 10 µL 2X PCR Master Mix ve 3 µL nükleaz içermeyen su eklendi (Tablo 3.5). RT-qPCR'da gen ifadeleri için analiz edilen spesifik primerler Tablo 3.6'da verildi (Bergin ve diğ., 2006; Mukherje ve diğ., 2012).

Tablo 3.5. RT-qPCR için hazırlanan reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Miktar (µL)
cDNA *	5
Nükleaz içermeyen su	3
Forward primer	1
Reverse primer	1
RT-qPCR SYBR Green Master Mix (2X)	10
Toplam hacim	20

*2 µg şeklinde hazırlanan cDNA'lar kullanıldı.

Tablo 3.6. qRT-PCR ile gen ifadeleri için kullanılan primerler

Primer	Oligonükleotitler	Referans
β -aktin F	5'-GGGACGATATGGAGAAGATCTG-3'	Bergin ve diğ., 2006
β -aktin R	5'-CACGCTCTGTGAGGATCTTC-3'	Bergin ve diğ., 2006
Transferrin F	5'-CCCGAAGATGAACGATCAC-3'	Bergin ve diğ., 2006
Transferrin R	5'-CGAAAGGCCTAGAACGTTTG-3'	Bergin ve diğ., 2006
Galiyomisin F	5'-CCTCTGATTGCAATGCTGAGTG-3'	Bergin ve diğ., 2006
Galiyomisin R	5'-GCTGCCAAGTTAGTCAACAGG-3'	Bergin ve diğ., 2006
p38 MAPK F	5'-CTGATGGCAAGAGGATTCG-3'	Mukherje ve diğ., 2012
p38 MAPK R	5'-CTTGGGACGCCTAGTCAGG-3'	Mukherje ve diğ., 2012

β -aktin geni cDNA'nın miktarının ölçülmesinde kontrol olarak kullanıldı. Bunun nedeni, β -aktin gibi housekeeping genler larvanın immünolojik durumundan bağımsız olarak sentezlenirler (Schuhmann ve diğ., 2003). Bütün primerler için qRT-PCR döngüleri Nucleogene qPCR SYBR Green PCR Kitine göre Tablo 3.7'de gösterildiği şekilde uygulandı.

Tablo 3.7. RT-qPCR döngüleri

RT-PCR döngüleri	Sıcaklık (°C)	Zaman
Başlangıç denatürasyon	95	3 dk
Denatürasyon *	95	15 s
Bağlanma *	Primerlerin T _m değeri **	50 s
Uzama *	72	10 s
Sonlanma	4	∞

*Denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamalarını kapsayan 40 döngü yapıldı.

**Her gen bölgesi için farklı erime sıcaklıkları (T_m'ler) belirlendi.

Her bir gen bölgesinin farklı T_m değerleri bulunmaktadır. RT-qPCR analizleri uygulanırken NCBI üzerinden primerlerin gen dizileri kontrol edilerek T_m değerleri belirlendi. Gen bölgelerinin T_m değerleri Tablo 3.8'de gösterildi.

Tablo 3.8. RT-qPCR analizlerinde primerlerin Tm değerleri

Primer	Tm değerleri (°C)	RT-PCR sıcaklığı (°C) *
β-aktin F	57,55	57,8
β-aktin R	58,08	57,8
Transferrin F	55,83	56,5
Transferrin R	57,12	56,5
Galiyomisin F	59,9	59,7
Galiyomisin R	59,46	59,7
p38 MAPK F	55,79	57,6
p38 MAPK R	59,48	57,6

*RT-PCR analizlerinde Forward ve Reverse primerlerin ortalaması alınarak Tm değerleri hesaplandı.

Biorad RT-PCR'ın yazılım talimatına göre her bir gen bölgesinin hesaplaması yapılarak bütün değerler β-aktin geninin miktarına göre normalize edildi. Gen ifadelerindeki değişiklikler aşağıda yer alan denklem 3.2a, 3.2b ve 3.2c ile hesaplandı.

$$\Delta_{CT} = CT (cDNA1, \text{Örnek Gen}) - CT (cDNA2, \text{Housekeeping Gen}) \quad (3.2a)$$

$$\Delta\Delta_{CT} = \Delta_{CT} (\text{Örnek}) - \Delta_{CT} (\text{Kontrol Ortalama}) \quad (3.2b)$$

$$2^{\Delta\Delta_{CT}} = \text{Gen ifadesi sonucu} \quad (3.2c)$$

PCR analizleri sonucu elde edilen veriler Qiagen RT-PCR Array online analiz programı (Qiagen versiyon 4.1) kullanılarak $\Delta\Delta_{CT}$ yöntemiyle housekeeping gen seviyelerine göre normalize edildi ve $p < 0,05$ sınır olarak kullanıldı. Her bir deney grubundan ($n = 3$) alınan veri kopyaları ($n = 3$) ortalamaları programa yüklendi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Tüm analizlerde SPSS istatistik yazılım programı (IBM SPSS Statistics sürüm 27.0, Chicago, IL) kullanıldı. LC_{50} değerleri IBM SPSS Statistics version 27, Probit Analysis programı kullanılarak %95 güven seviyeleri ile belirlendi (Finney, 1971). Konsantrasyona bağlı değişiklikler Levene testi ile veri dağılımının normalliği açısından test edildi. Analizlerden önce, yüzde veriler arksin dönüşümü ile normalize edildi. Tüm analizler için tek yönlü ANOVA testi yapıldı. Homojen olan gruplar Tukey's Honestly Significant Difference (Tukey HSD) ile değerlendirilirken, homojen olmayan gruplar

için Tamhane’s T2 Post Hoc testleri kullanıldı. Anlamlılık değeri olarak $p<0,05$ kabul edildi. PCR analizleri “PCR Array Veri Analiz Web Programı (QIAGEN versiyon 4,1)” ile yapıldı.



4. BULGULAR

4.1. Alüminyum Oksit Nanopartiküllerin Özellikleri ve Karakterizasyonu

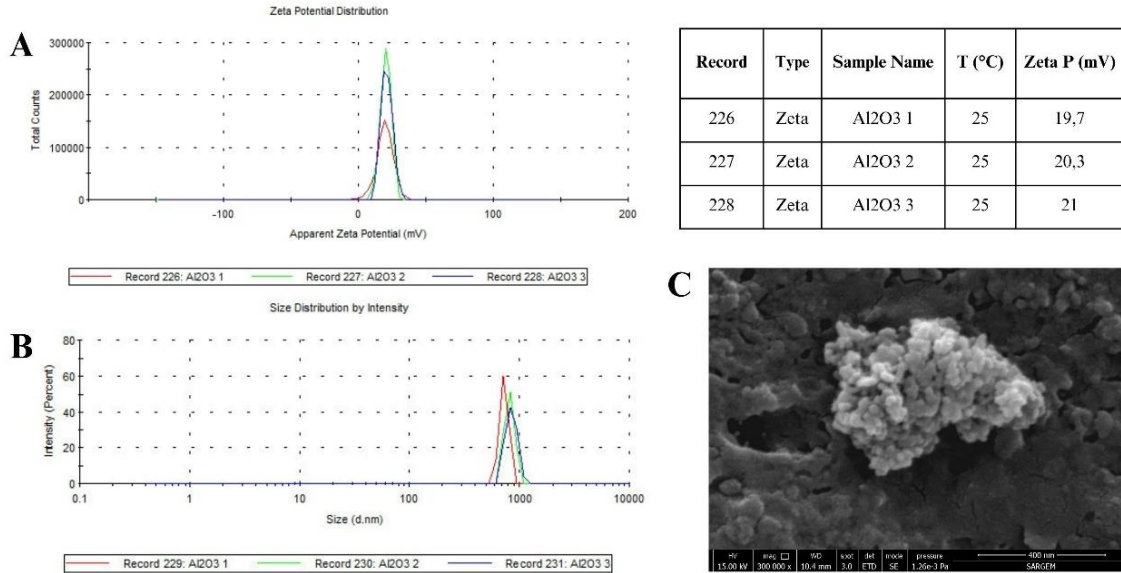
Nano-toz şeklinde ve gamma fazda ticari olarak satın alınan Al_2O_3 NP (544833, Sigma Aldrich, Almanya) 50 nm'nin altında boyutlara sahip olduğu üretici firma tarafından iletimli elektron mikroskopunda (TEM) gösterilmiştir. Yüzey analiz ve porozite cihazında (BET) belirtilen yüzey alanı özellikleri $>40 \text{ m}^2/\text{g}$ 'dır. Ayrıca 200 kalite seviyesine sahip, erime sıcaklığı 2040°C (L) ve moleküler ağırlığı $101,96 \text{ g/mol}$ 'dür (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Alüminyum oksit nanopartiküllerin özellikleri

Alüminyum oksit nanopartiküllerin özellikleri	
Formu	Toz
Türü	Gamma faz
Partikül boyutu	$<50 \text{ nm}$ (TEM)
Yüzey alanı	$>40 \text{ m}^2/\text{g}$ (BET)
Kalite seviyesi	200
Erime sıcaklığı	2040°C (L)
Moleküler ağırlığı	$101,96 \text{ g/mol}$

Yapılan zeta potansiyel ölçümleri sonucunda Al_2O_3 NP'lerin potansiyel değeri ortalama $20,3 \text{ mV}$ bulundu (Şekil 4.1.A). Elde edilen zeta potansiyeli nanopartiküllerin orta derecede kararlı olduğunu göstermektedir. Zetasizer cihazında yapılan analizler sonucunda parçacık boyutu ortalama $801,07 \text{ nm}$ olarak bulundu. Ancak NP boyutları 50 nm 'den küçük olmasına rağmen partiküllerde topaklanma gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil

4.1.B). Al₂O₃ NP'lerin SEM görüntüleri topaklanmanın gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.1.C).



Şekil 4.1. Alüminyum oksit nanopartiküllerin (A) zeta (ζ) potansiyel eğrileri ve mV değerleri, (B) boyut dağılımı eğrileri ve (C) taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (400 nm)

4.2. Polistiren Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

20 mg PS peletlerinden (Molekül ağırlığı: 35,000 g/mol, yoğunluk; 25 °C'de 1,06 g/mL) prob sonikatör ile elde edilen partiküllerin ortalama boyutu 275,6 nm olarak bulundu. PDI ortalaması 0,1 olarak belirlendi ve NP boyutlarının homojen dağılım gösterdiği görüldü (Tablo 4.2). PS peletlerinin 25 mg tartılarak başlanan tekli emülsiyon yönteminde sonikasyon yapılarak elde edilen partiküllerin ortalama boyutu 351,7 nm ve PDI değeri 0,2 olarak bulundu (Tablo 4.2).

PS peletlerinin 20 ve 25 mg tartılarak başlanan tekli emülsiyon yönteminde homojenizatör ile elde edilen partiküllerin ortalama boyutu sırasıyla 715,4 nm ve 774,6 nm olarak bulundu. Bu partiküllerin PDI değerleri ise sırasıyla 0,3 ve 0,2 olduğu için homojen bir dağılım göstermediği belirlendi (Tablo 4.2). Elde edilen partiküllerin üç okuma içeren boyut dağılım eğrileri Şekil 4.2'de gösterildi. Her grafik eğrisinde görülen Z-ortalama çapları üç değerlerin ortalaması şeklinde Tablo 4.2'de verildi.

Sonikasyon ile tekli emülsiyon yöntemi uygulandığında 20 ve 25 mg PS'den elde edilen kuru nanopartiküllerin toplanma verimi sırasıyla 5,2 mg ve 6,4 mg olarak bulundu (Tablo 4.2). Homojenizasyonla uygulanan yöntem sonucu ise 20 mg ve 25 mg PS'den sırasıyla 12,6 mg ve 18,2 mg nanopartikül toplanma verimi tespit edildi (Tablo 4.2). PS NP'lerin hazırlanması için prob sonikatör ve homojenizatör kullanımı karşılaştırıldığında, 20 mg PS peletlerinden elde edilen prob sonikatör ile daha homojen dağılım gösteren (PDI değeri 0,1) ve daha küçük nano boyutlu (ortalama 275,6 nm) partiküller elde edilerek tüm analizlerde kullanıldı.

Tablo 4.2. Polistiren nanopartiküllerinin Z-ortalama çapları (nm), polidispersite indeksleri ve elde edilen nanopartikül miktarı (mg)

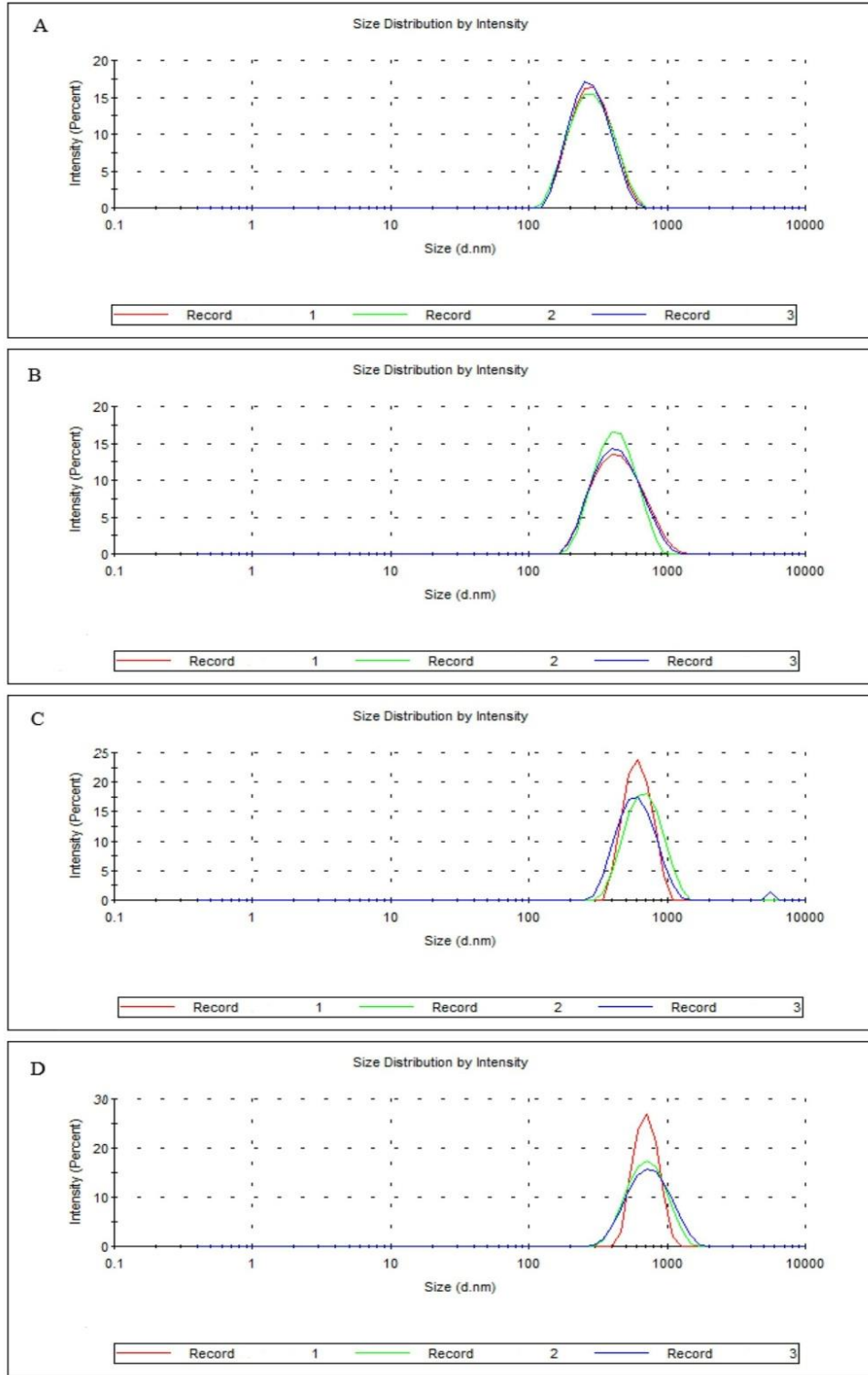
Başlangıçta tartılan PS miktarı / üretim şekli	Z-ortalama çapları (nm) *	Polidispersite indeksleri (PDI) *	Elde edilen PS NP miktarı (mg) ***
20 mg / Prob Sonikatör	275,6 **	0,1 **	5,2
25 mg / Prob Sonikatör	351,7	0,2	6,4
20 mg / Homojenizatör	715,4	0,3	12,6
25 mg / Homojenizatör	774,6	0,2	18,2

* PS NP'ler üç kez ölçüldü ve Zetasizer ile ortalaması alındı

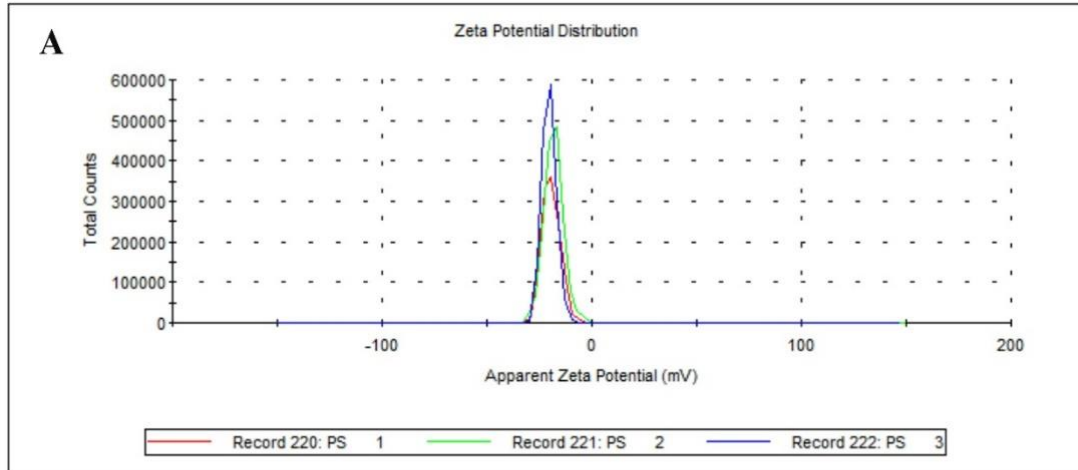
**PS'den elde edilen nano boyuttaki NP'lerin analizlerde kullanıma uygun özellikleri.

***Liyofilizasyon sonrası elde edilen NP miktarı

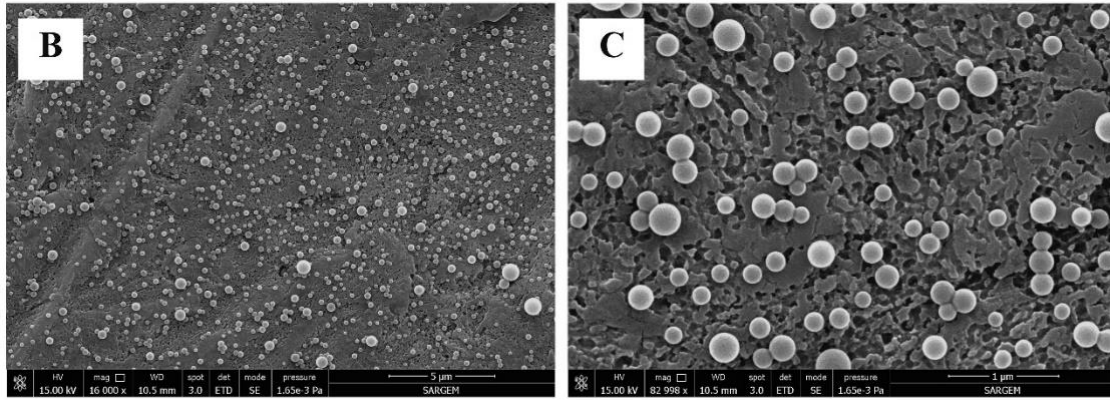
Malvern Zetasizer Nano ZS 90 cihazı ile yapılan ölçüm sonrasında PS NP'lerin zeta potansiyeli -19,3 mV olarak ölçüldü (Şekil 4.3.A). Elektrokinetik potansiyel olarak da bilinen zeta potansiyeli partiküllerin kararlı olduğunu gösterdi. PS NP'lerin yüzey morfolojisinin SEM görüntüleri Şekil 4.3.B-4.3.C'de verildi. Laboratuvarında hazırlanan bu NP'lerin küresel partiküllerden oluştuğu gösterildi. Ayrıca PS NP'lerin topaklanma eğilimi göstermediği gözlemlendi.



Şekil 4.2. PS NP'lerin boyut dağılım eğrileri, (A) 20 mg polistirenden sonikasyon ile elde edilen NP boyutu, (B) 25 mg polistirenden sonikasyon ile elde edilen NP boyutu, (C) 20 mg polistirenden homojenizasyon ile elde edilen NP boyutu, (D) 25 mg polistirenden homojenizasyon ile elde edilen NP boyutu



Record	Type	Sample Name	T (°C)	ZP (mV)
220	Zeta	PS 1	25	-19,4
221	Zeta	PS 2	25	-18,1
222	Zeta	PS 3	25	-20,4

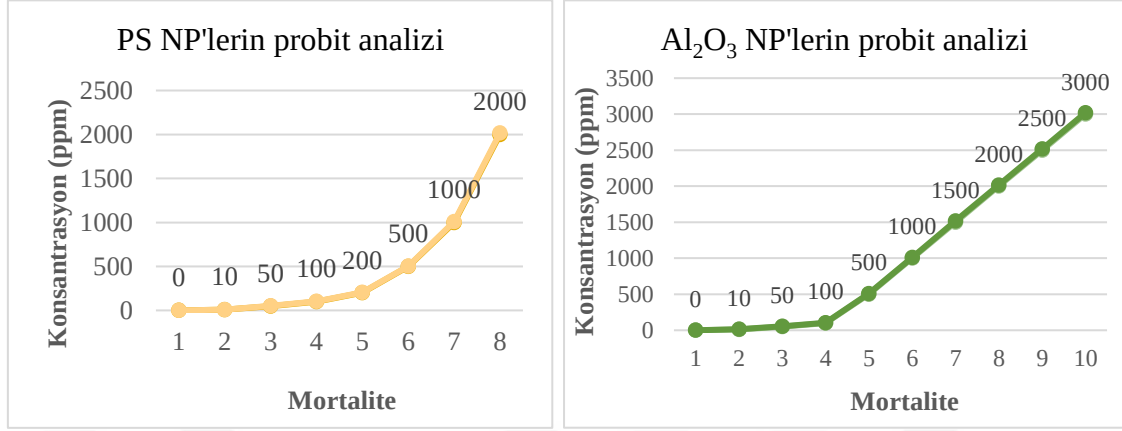


Şekil 4.3. Polistiren nanopartiküllerin, (A) zeta (Ç) potansiyel eğrileri, (B) 5µm skalada taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (C) 1µm skalada taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü

4.3. Lethal Konsantrasyon 50 (LC₅₀)

Al₂O₃ / PS NP'lerin deneysel konsantrasyonlarının tespiti için yapılan probit analizi (konsantrasyona bağlı mortalite) sonuçları Şekil 4.4'de gösterildi. *G. mellonella* için, Al₂O₃ NP'lerin LC₅₀ değeri 788,96 ppm ve PS NP'lerin LC₅₀ değeri 885,98 ppm olarak bulundu. Bu iki NP'ün LC₅₀ değerlerinin kantitatif olarak birbirine yakın olduğu görüldü. Belirlenen LC₅₀ değerlerinin altında kalacak şekilde üç konsantrasyon ve bu değerin üzerinde kalan bir konsantrasyon seçilerek deney grupları oluşturuldu. Bu

nedenle 50, 100, 500 ve 1000 ppm konsantrasyonları Al₂O₃ ve PS NP'ler için deneysel konsantrasyonlar olarak kullanıldı.

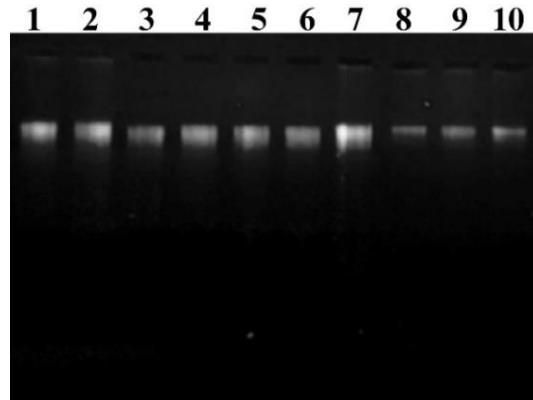


Şekil 4.4. Alüminyum oksit ve polistiren nanopartiküllerin probit analizi grafikleri

4.4. DNA Metilasyonu

4.4.1. İzole Edilen DNA'ların Konsantrasyonları, Saflıkları ve Jel Görüntüleri

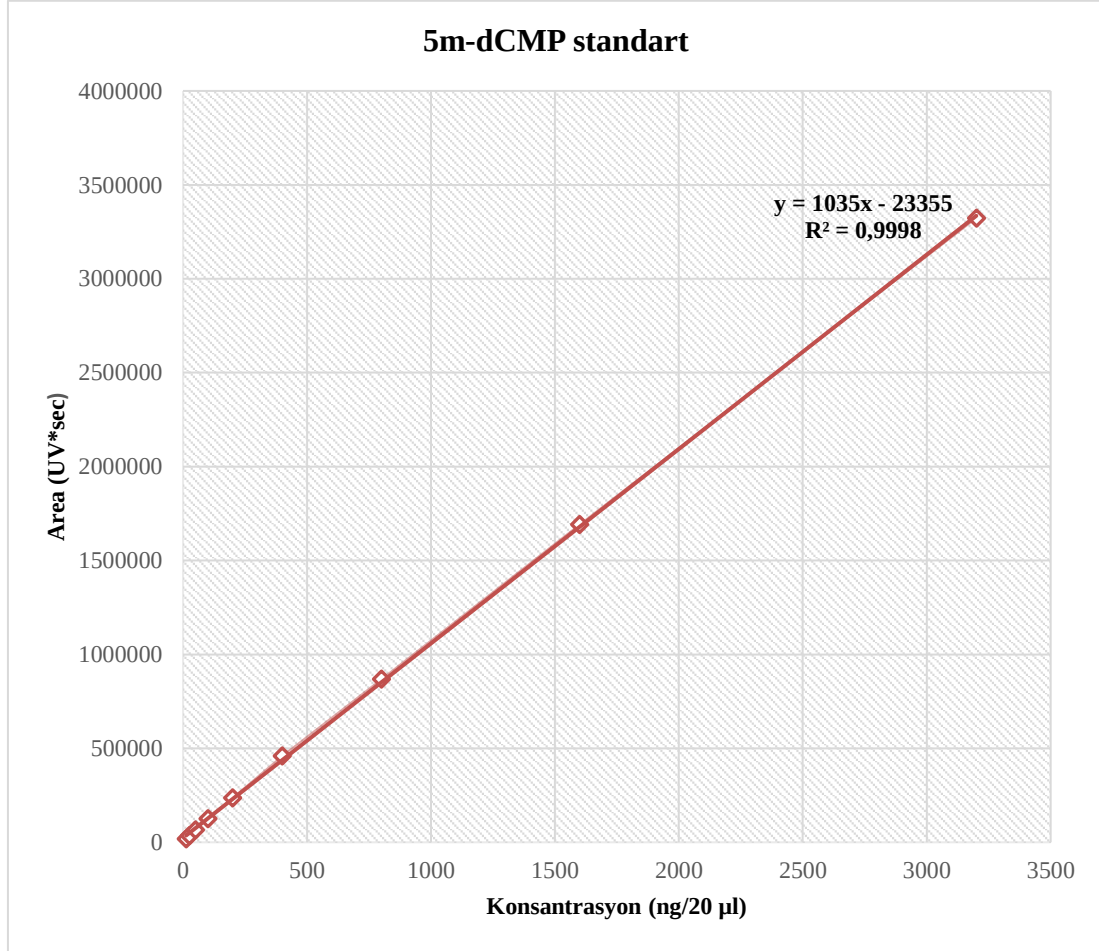
Agaroz jelde (%1'lik) yürütülen DNA'ların örnek görüntüsü Şekil 4.5'de verildi. Konsantrasyonlar (ng) 1 µL DNA izolatu içerisinde bulunan RNA miktarını ifade etmektedir. Ayrıca A_{260/230} DNA saflıklarının 2,0-2,2 ve A_{260/280} saflıklarının ise 1,8-2,0 arasında değişen değerlerin kullanılmasına dikkat edildi. Şekil 4.5'deki DNA jel görüntüleri Al₂O₃ (1-5; sırasıyla Kontrol, 50, 100, 500 ve 1000 ppm) ve PS (6-10; sırasıyla Kontrol, 50, 100, 500 ve 1000 ppm) NP'leri oluşturan tüm gruplardan birer örnek olacak şekilde verildi.



Şekil 4.5. İzole edilen DNA'ların jel elektroforez görüntüsü

4.4.2. Global DNA Metilasyonu

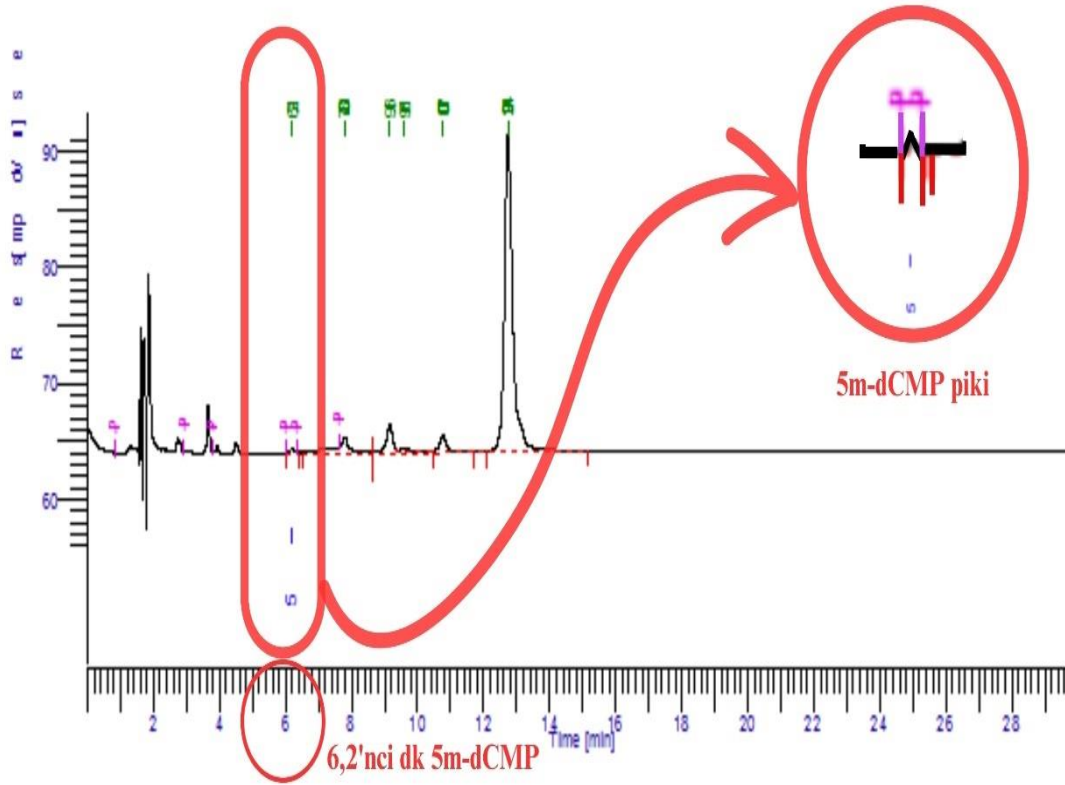
Çeşitli konsantrasyonlarda (3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 20 ve 12,5 ng/20 µL) hazırlanan 5m-dCMP standartlarından oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.6’da gösterildi.



Şekil 4.6. Dezoksi-5-metilsitidin-3'-monofosfat nükleotidine ait kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrisinden elde edilen 5m-dCMP'ye ait R^2 değeri 0,9998 şeklinde bulundu. Deneylerde 5m-dCMP ile aynı alıkonma süresine sahip olan pikler tanımlandı ve global DNA metilasyonun hesaplanmasında kullanıldı. Şekil 4.7'de 5m-dCMP standardı ile belirlenen bir örnek piki verildi. Buna göre beşinci karbondan metil grubu bağlanan sitozin bazlarının oluşturduğu pik 6,2 dk sonra tepe noktasına ulaştı. Birinci ve ikinci nesil larvalardan izole edilen DNA nükleotitleri 6,2 dk'da verdiği pik metil grubu bağlanmış sitozinlerin konsantrasyonunu temsil etmektedir (Şekil 4.7). Kalibrasyon

eğrisinde oluşturulan denkleme göre larvaların 5m-dCMP konsantrasyonu hesaplandı. Al₂O₃ ve PS NP etkisi ile birinci ve ikinci nesil *G. mellonella* larvalarında hesaplanan metilasyon konsantrasyonları ng şeklinde sırasıyla Tablo 4.3. ve 4.4’de gösterildi.



Şekil 4.7. HPLC’de yapılan global DNA metilasyon ölçümüne ait örnek pikler. Standart olarak dezoksi-5-metilsitidin-3’-monofosfat (5m-dCMP) kullanıldı. Kolonda 6,2. dk’da oluşan pik 5m-dCMP pikidir. Larvalardan izole edilen DNA örneklerinde bu dk’da oluşan pik seçildi ve metilasyon konsantrasyonu kalibrasyon eğri denklemleri kullanılarak hesaplandı. HPLC kolonu (ACE 3 C8, 125 × 4,0 mm), Akış; 0,75 mL/dk, Mobil faz; 50 mM Amonyum Ortofosfat (pH: 4,1), Absorbans; 280 nm

Kontrol gruplarının tamamında 1000 ng DNA’da 5m-dCMP konsantrasyonu ortalama 49,1 ng olarak bulundu. Yani hiçbir uygulama yapılmayan *G. mellonella* larvasında %4,9 oranında global DNA metilasyonu gözlemlendi. Al₂O₃ NP’lerin DNA metilasyonuna etkisi iki nesilde de benzerdi; ancak ikinci nesildeki metilasyon oranları sayısal olarak daha düşük değerler gösterdi. Al₂O₃ NP’lerin kontrol grupları ilk nesilde 48,86 ± 1,69 ng, ikinci nesilde ise 49,26 ± 1,01 ng olarak belirlendi. F0 larvalarda 50 ppm grubunda %9,3’lük bir artış saptandı ve 53,42 ± 2,13 ng konsantrasyonda metillenmiş sitozin olduğu belirlendi (p<0,05; Tablo 4.3). Bu durum F1 larvaları için 52,11 ± 1,25 ng olarak

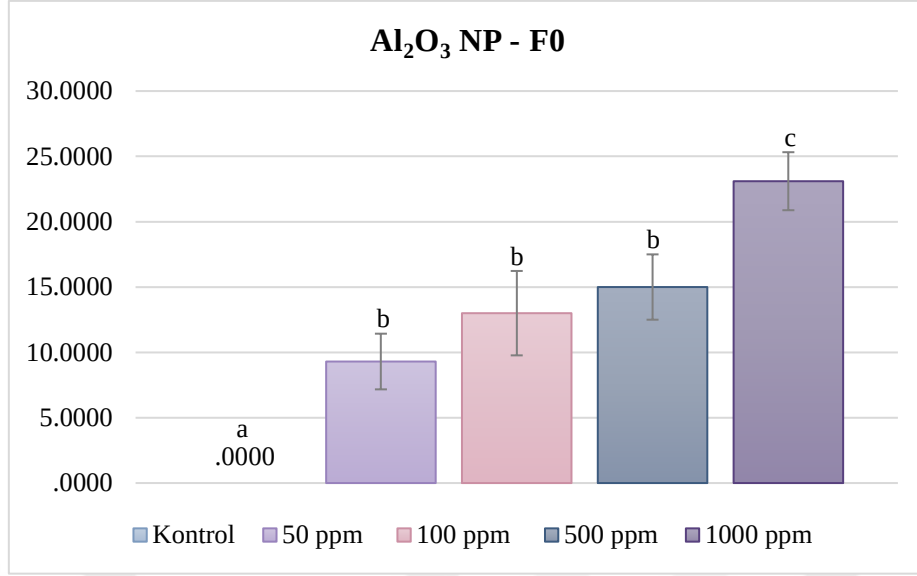
bulundu ve metilasyon %5,8'lik bir artış gösterdi. 100 ppm gruplarında ise F0'da %13 artış ($55,23 \pm 3,23$ ng) gözlenirken F1'de ise %4,8 artış ($51,61 \pm 1,52$ ng) gözlemlendi ($p < 0,05$; Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) ve F1'deki bu artışın istatistiksel olarak kontrol grubuna yakın değerler gösterdiği belirlendi.

Tablo 4.3. Birinci (F0) ve ikinci (F1) nesil *Galleria mellonella* larvalarında alüminyum oksit nanopartiküllerinin DNA metilasyonu konsantrasyonlarına etkisi

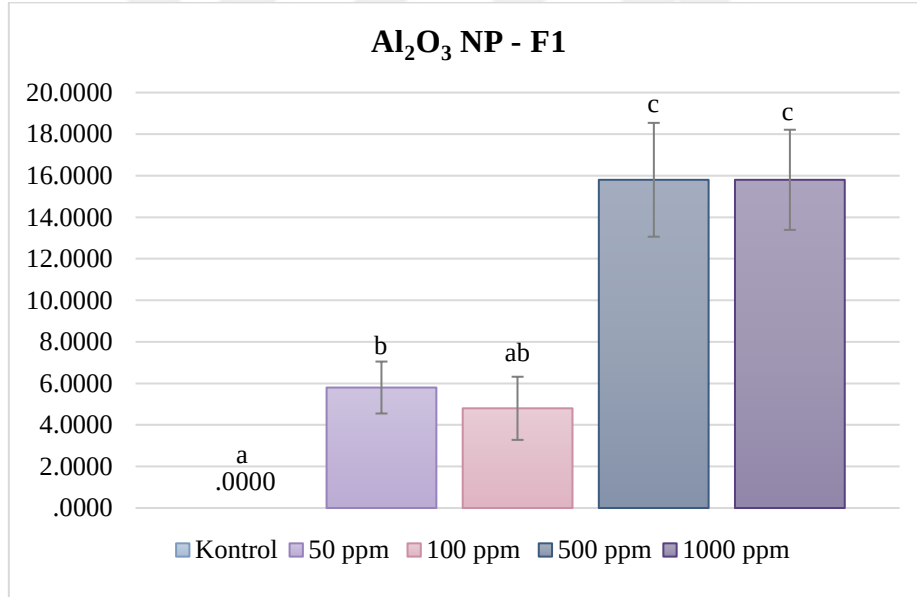
Gruplar	Al ₂ O ₃ NP 5m dCMP (ng/1 µg DNA) *	
	F0	F1
Kontrol	$48,86 \pm 1,69^a$	$49,26 \pm 1,01^a$
50 ppm	$53,42 \pm 2,13^b$	$52,11 \pm 1,25^b$
100 ppm	$55,23 \pm 3,23^b$	$51,61 \pm 1,52^{ab}$
500 ppm	$56,19 \pm 2,50^b$	$57,06 \pm 2,74^c$
1000 ppm	$60,12 \pm 2,22^c$	$58,31 \pm 3,41^c$
df	4	4
F	29,084	30,807
sig.	0,000	0,000

*Tüm veriler Ortalama $\pm$ Standart Sapma (SS) olarak sunuldu ($p < 0,05$; Tek yönlü ANOVA, Post Hoc; Tukey's HSD / Tamhane's T2). Gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar a-c harfleri kullanılarak ifade edildi.

Al₂O₃ NP'lerin 500 ppm gruplarındaki etkileri ise F0'da %15 ($56,19 \pm 2,50$ ng), F1'de %15,8 ($57,06 \pm 2,74$ ng) olarak belirlendi ($p < 0,05$; Tablo 4.3). Bu konsantrasyonda uygulanan Al₂O₃ NP'ler ikinci nesil larvalarda daha etkili epigenetik aktarım olduğunu gösterdi. En yüksek konsantrasyonu oluşturan 1000 ppm Al₂O₃ NP gruplarında F0'da $60,12 \pm 2,22$ ng ve %23,1 artış ile en fazla etki gözlenirken, F1'de $58,31 \pm 3,41$ ng ve %18,4 artış ile 500 ppm grubunda gözlenen etkiye benzerdi ($p < 0,05$) (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9; Tablo 4.3).



Şekil 4.8. Alüminyum oksit nanopartiküllerinin birinci (F0) nesil *Galleria mellonella* larvalarında kontrol grubuna göre metilasyon yüzdelilerindeki değişiklikler



Şekil 4.9. Alüminyum oksit nanopartiküllerinin ikinci (F1) nesil *Galleria mellonella* larvalarında kontrol grubuna göre metilasyon yüzdelilerindeki değişiklikler

PS NP'lerin DNA metilasyonuna etkisi iki nesilde de paralellik gösterdi. Yüksek konsantrasyonları oluşturan 500 ve 1000 ppm PS NP uygulanan birinci ve ikinci nesilde anlamlı değişiklikler gözlemlendi ($p < 0,05$). Aksine düşük konsantrasyonları oluşturan 50 ve 100 ppm NP uygulaması DNA metilasyonundaki artış ve metilasyon aktarımı önemli değildi. F0 larvalarda 50 ppm PS NP grubunda %2,3'lük bir artış saptandı ve $49,97 \pm$

0,86 ng metillenmiş sitozin olduğu belirlendi. F1 larvalarında ise $50,29 \pm 1,36$ ng 5m-dCMP bulundu ve %2,1'lik artış gözlemlendi (Tablo 4.4). İki nesilde de 50 ppm sayısal olarak benzer bir artış gösterdi.

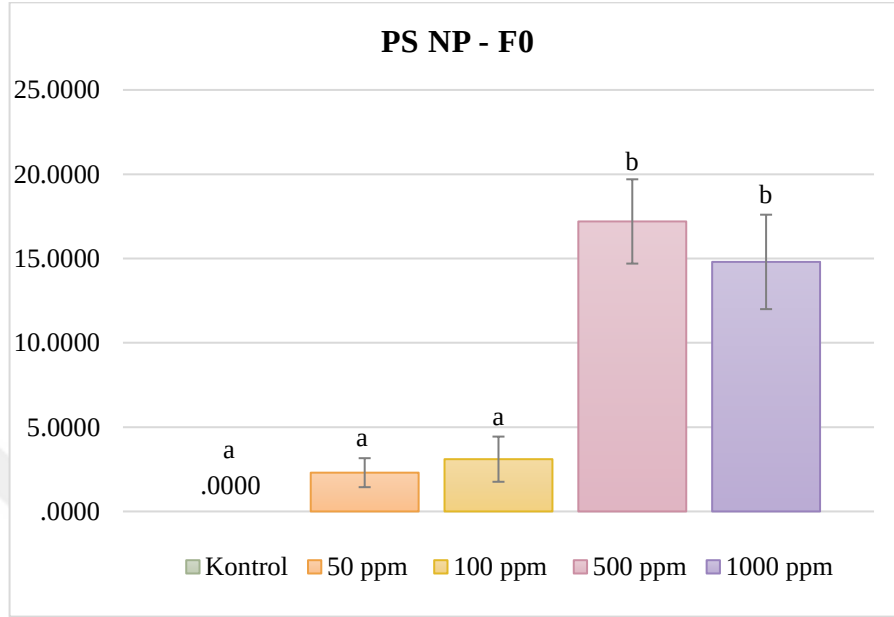
Tablo 4.4. Birinci (F0) ve ikinci (F1) nesil *Galleria mellonella* larvalarında polistiren nanopartiküllerinin DNA metilasyonu konsantrasyonlarına etkisi

Gruplar	PS NP 5m dCMP (ng/1 µg DNA) *	
	F0	F1
Kontrol	$48,87 \pm 1,69^a$	$49,25 \pm 1,01^a$
50 ppm	$49,97 \pm 0,86^a$	$50,29 \pm 1,36^a$
100 ppm	$50,44 \pm 1,34^a$	$51,15 \pm 0,95^a$
500 ppm	$57,29 \pm 2,54^b$	$55,11 \pm 3,28^b$
1000 ppm	$56,08 \pm 2,88^b$	$56,10 \pm 2,63^b$
df	4	4
F	36,954	21,472
sig.	0,000	0,000

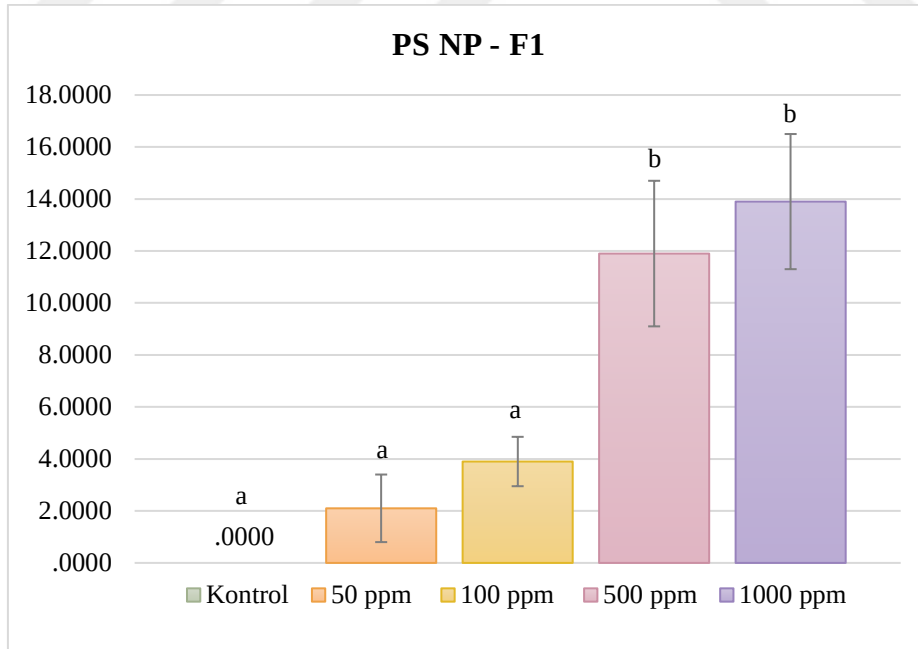
*Tüm veriler Ortalama $\pm$ Standart Sapma (SS) olarak sunuldu ($p < 0,05$; Tek yönlü ANOVA, Post Hoc; Tukey's HSD). Gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar a-b harfleri kullanılarak ifade edildi.

PS NP uygulanan 100 ppm gruplarında ise F0'da %3,1 artış ve DNA metilasyon konsantrasyonu $50,44 \pm 1,34$ ng gözlenirken, F1'de ise %3,9 artış ve metilasyon konsantrasyonu $51,15 \pm 0,95$ ng şeklinde belirlendi (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). İki nesildeki bu artışlar birbirine çok yakın ve kontrol grubuna benzer değerler gösterdi. 500 ppm PS NP'ler DNA metilasyonunu F0'da %17,2 ($57,29 \pm 2,54$ ng), F1'de ise %11,9 ($55,11 \pm 3,28$ ng) arttırdı ($p < 0,05$). DNA metilasyonundaki ilk belirgin ve önemli artışlar iki nesilde de 500 ppm PS NP konsantrasyonunda görüldü. 1000 ppm PS NP gruplarında F0'da $56,08 \pm 2,88$ ng ve %14,8, F1'de ise $56,10 \pm 2,63$ ng ve %13,9 artış

ile 500 ppm grubunda gözlenen etkiye yakındı ($p < 0,05$) (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11; Tablo 4.4).



Şekil 4.10. Polistiren nanopartiküllerinin birinci (F0) nesil *Galleria mellonella* larvalarında kontrol grubuna göre metilasyon yüzdelerindeki değişiklikler



Şekil 4.11. Polistiren nanopartiküllerinin ikinci (F1) nesil *Galleria mellonella* larvalarında kontrol grubuna göre metilasyon yüzdelerindeki değişiklikler

4.5. Enkapsülasyon

Al₂O₃ NP uygulanan larvalarda 4. saat ve 24. saat enkapsülasyon yüzde değerleri sırasıyla Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’da gösterildi. Al₂O₃ NP’ler ile muamele edilmiş larvaların enkapsülasyon tepkileri değerlendirildiğinde, Sephadex boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra enkapsüle olmamış boncuk sayısında 50 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlarda önemli bir artış gözlemlendi. 50, 100, 500 ve 1000 ppm artan konsantrasyonlarda sırasıyla %40,76 ± 2,37, %49,6 ± 2,31, %53,82 ± 2,22 ve %55,49 ± 3,90 oranlarında bir artış gözlemlendi. Ayrıca 50 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlarda zayıf ve güçlü enkapsülasyon tepkileri gösteren boncukların sayısında önemli bir düşüş gözlemlendi (p<0,05). Toplam boncuklar arasında zayıf enkapsüle olan boncuklar 50 ppm Al₂O₃ NP grubunda %48,43 ± 2,10, 100 ppm grubunda %41,38 ± 2,03, 500 ppm grubunda %38,19 ± 1,74 ve 1000 ppm grubunda %40,33 ± 3,26 şeklinde azaldığı tespit edildi (p<0,05). Güçlü enkapsüle olan boncuklar ise 50 ppm Al₂O₃ NP uygulanan grupta %10,80 ± 0,87, 100 ppm grubunda %9,04 ± 0,97, 500 ppm grubunda %8,01 ± 1,44 ve 1000 ppm grubunda %4,2 ± 1,14 olduğu belirlendi (p<0,05; Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra alüminyum oksit nanopartikülleri ile *Galleria mellonella* larvalarında gerçekleşen enkapsülasyon seviyelerinde değişiklik (%)

Al ₂ O ₃ (ppm)	4 saat* (% Ortalama ± Standart Hata)**			
	Total boncuk sayısı	Enkapsüle Olmamış	Zayıf Enkapsülasyon	Güçlü Enkapsülasyon
Kontrol	307	34,51 ± 0,77 ^a	51,20 ± 1,26 ^a	14,29 ± 0,99 ^a
50	270	40,76 ± 2,37 ^{ab}	48,43 ± 2,10 ^{ab}	10,80 ± 0,87 ^{ab}
100	257	49,6 ± 2,31 ^{bc}	41,38 ± 2,03 ^{bc}	9,04 ± 0,97 ^b
500	273	53,82 ± 2,22 ^c	38,19 ± 1,74 ^c	8,01 ± 1,44 ^{bc}
1000	304	55,49 ± 3,90 ^c	40,33 ± 3,26 ^{bc}	4,2 ± 1,14 ^c
df		4	4	4
F		12,59	6,60	11,32
Sig.		,00	,00	,00

* Her veri üç paralel halinde 15 larvanın % “Ortalama ± Standart Hata”sını sembolize eder.

** Bir sütunda aynı harfi içeren ortalamalar (a-c) önemli ölçüde farklı değildir (p > 0,05; Tukey’s HSD)

Enjeksiyondan 24 saat sonra Al₂O₃ NP uygulanan larvalarda enkapsüle olmamış boncuk sayısında 100 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlarda önemli bir artış gözlemlendi. NP uygulanmamış ve 50 ppm Al₂O₃ NP grubunda sırasıyla %14,27 ± 1,35 ve %18,92 ± 1,18 boncuklarda enkapsülasyon gerçekleşmediği görüldü (p<0,05). Enkapsüle olmamış boncuklar 100, 500 ve 1000 ppm Al₂O₃ NP dozlarında sırasıyla %28,3 ± 2,09, %44,39 ± 1,77 ve %48,27 ± 2,79 şeklinde bulundu (p<0,05). Bununla birlikte zayıf enkapsülasyon tepkisi gösteren boncukların sayısında 50 ve 100 ppm’de önemli artışlar (sırasıyla %51,61 ± 2,28 ve %48,71 ± 1,93) gözlemlendi (p<0,05). 500 ve 1000 ppm Al₂O₃ NP gruplarında ise sırasıyla %43,23 ± 1,70 ve %43,54 ± 2,30 oranında artışlar görüldü. Al₂O₃ NP uygulanmış larvalardan alınan hemositlerin Sephadex boncuklarına karşı güçlü enkapsülasyon tepkisi, boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra 50 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlarda önemli bir düşüş gösterdi. NP uygulanmayan güçlü enkapsüle olan boncuklar %48,89 ± 1,94 oranında belirlendi. Ancak artan dozlara göre bu oran sırasıyla %29,48 ± 2,24, %22,99 ± 2,23, %12,49 ± 1,58 ve %8,19 ± 1,70 oranında azaldı (p<0,05; Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra alüminyum oksit nanopartikülleri ile *Galleria mellonella* larvalarında gerçekleşen enkapsülasyon seviyelerinde değişiklik (%)

24 saat* (% Ortalama ± Standart Hata)**				
Al ₂ O ₃ (ppm)	Total boncuk sayısı	Enkapsüle Olmamış	Zayıf Enkapsülasyon	Güçlü Enkapsülasyon
Kontrol	260	14,27 ± 1,35 ^a	36,86 ± 0,79 ^a	48,89 ± 1,94 ^a
50	284	18,92 ± 1,18 ^a	51,61 ± 2,28 ^c	29,48 ± 2,24 ^b
100	292	28,3 ± 2,09 ^b	48,71 ± 1,93 ^{bc}	22,99 ± 2,23 ^b
500	236	44,39 ± 1,77 ^c	43,23 ± 1,70 ^{ab}	12,49 ± 1,58 ^c
1000	265	48,27 ± 2,79 ^c	43,54 ± 2,30 ^{ab}	8,19 ± 1,70 ^c
df		4	4	4
F		61,46	9,11	67,40
Sig.		0,000	0,000	0,000

* Her veri üç paralel halinde 15 larvanın % “Ortalama ± Standart Hata” sını sembolize eder.

** Bir sütunda aynı harfi içeren ortalamalar (a-c) önemli ölçüde farklı değildir (p<0,05; Tukey’s HSD)

Al₂O₃ NP gruplarında olduğu gibi PS NP'ler de aynı şekilde değerlendirildi. İncelenen örneklerin 4. ve 24. saat enkapsülasyon yüzdeleri Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de gösterildi. Enjeksiyonu takiben 4. saatte enkapsüle olmamış boncukların sayısında 500 ve 1000 ppm PS NP konsantrasyonlarında sırasıyla %36,20 ± 3,05 ve %49,92 ± 4,24 oranında önemli bir artış gözlemlendi (p<0,05). Bununla birlikte zayıf enkapsülasyon tepkisi gösteren boncuk sayısı 1000 ppm konsantrasyonunda toplam boncuk sayısına göre %40,65 ± 3,80 şeklindeydi ve önemli derecede gruplar arasında azaldı (p<0,05). Hemositlerin Sephadex boncuklarına karşı güçlü enkapsülasyon tepkisi 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarında %28,15 ± 4,28 ve %20,05 ± 2,35 artarken, 500 ve 1000 ppm'de %10,10 ± 1,58 ve %9,44 ± 1,39 azaldı (p<0,05; Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra polistiren nanopartikülleri ile *Galleria mellonella* larvalarında gerçekleşen enkapsülasyon seviyelerinde değişiklik (%)

4 saat* (% Ortalama ± Standart Hata)**				
PS (ppm)	Total boncuk sayısı	Enkapsüle Olmamış	Zayıf Enkapsülasyon	Güçlü Enkapsülasyon
Kontrol	312	24,31 ± 2,65 ^a	56,27 ± 2,71 ^a	19,41 ± 1,59 ^{ab}
50	291	20,61 ± 3,26 ^a	51,22 ± 2,92 ^{ab}	28,15 ± 4,28 ^b
100	289	31,26 ± 2,73 ^{ab}	48,68 ± 2,23 ^{ab}	20,05 ± 2,35 ^b
500	309	36,20 ± 3,05 ^b	53,72 ± 2,35 ^a	10,10 ± 1,58 ^{bc}
1000	292	49,92 ± 4,24 ^c	40,65 ± 3,80 ^b	9,44 ± 1,39 ^c
df		4	4	4
F		12,57	4,39	9,85
Sig.		,00	,00	,00

* Her veri üç paralel halinde 15 larvanın % "Ortalama ± Standart Hata" sını sembolize eder.

** Bir sütunda aynı harfi içeren ortalamalar (a-c) önemli ölçüde farklı değildir (p<0,05; Tukey's HSD)

Enjeksiyondan 24 saat sonra PS NP ile muamele edilen larvalarda enkapsüle olmamış boncukların sayısında 100 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlarda önemli bir artış

gözlendi. Bu değerler artan dozlara göre sırasıyla $24,51 \pm 1,75$, $27,41 \pm 1,53$ ve $34,39 \pm 2,34$ şeklinde belirlendi ($p < 0,05$). Bununla birlikte zayıf enkapsülasyon tepkisi gösteren boncukların sayısında sadece 500 ppm grubunda $54,99 \pm 2,15$ 'lik bir artış gözlendi ($p < 0,05$). Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra PS NP uygulanmış larvalardan 50 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda hemositlerin boncuklara verdiği güçlü enkapsülasyon tepkisi artan dozlara göre sırasıyla $33,14 \pm 3,16$, $25,00 \pm 1,92$, $17,57 \pm 2,23$ ve $15,09 \pm 1,75$ 'lik önemli bir düşüş gözlendi ($p < 0,05$; Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra polistiren nanopartikülleri ile *Galleria mellonella* larvalarında gerçekleşen enkapsülasyon seviyelerinde değişiklik (%)

PS (ppm)	24 saat* (% Ortalama $\pm$ Standart Hata)**			
	Total boncuk sayısı	Enkapsüle Olmamış	Zayıf Enkapsülasyon	Güçlü Enkapsülasyon
Kontrol	278	$17,37 \pm 1,48^a$	$44,28 \pm 1,87^a$	$38,34 \pm 2,33^a$
50	309	$16,76 \pm 1,53^a$	$50,09 \pm 2,32^{ab}$	$33,14 \pm 3,16^{ab}$
100	264	$24,51 \pm 1,75^b$	$50,49 \pm 1,75^{ab}$	$25,00 \pm 1,92^{bc}$
500	310	$27,41 \pm 1,53^b$	$54,99 \pm 2,15^b$	$17,57 \pm 2,23^{dc}$
1000	270	$34,39 \pm 2,34^c$	$50,51 \pm 1,86^{ab}$	$15,09 \pm 1,75^d$
df		4	4	4
F		17,51	3,47	18,18
Sig.		0,000	0,010	0,000

* Her veri üç paralel halinde 15 larvanın % "Ortalama $\pm$ Standart Hata" sını sembolize eder.

** Bir sütunda aynı harfi içeren ortalamalar (a-d) önemli ölçüde farklı değildir ($p < 0,05$; Tukey's HSD)

4.6. Melanizasyon

G. mellonella'nın son dönem larvaları üzerinde Al_2O_3 ve PS NP konsantrasyonlarına verilen melanizasyon yanıtları da enkapsülasyon sonuçları ile birlikte değerlendirildi (Tablo 4.9, Tablo 4.10, Tablo 4.11, Tablo 4.12). Al_2O_3 NP'lerden etkilenen gruplarda

melanize olmamış boncukların yüzde değerleri 4 saat sonra sadece 1000 ppm grubunda ($81,60 \pm 1,98$) artarken (Tablo 4.9), 24 saat sonra 500 ve 1000 ppm grubunda (sırasıyla $71,3 \pm 1,51$ ve $75,69 \pm 3,33$) artış gösterdi ($p < 0,05$; Tablo 4.10). Zayıf melanizasyon tepkilerinde ise 4. saatte 50 ppm grubunda ($10,88 \pm 1,41$) artış gözlemlendi ($p < 0,05$). 24. saatte ise 500 ve 1000 ppm gruplarında $8,04 \pm 0,70$ ve $5,71 \pm 1,13$ azalmalar görüldü ($p < 0,05$).

Tablo 4.9. Boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra alüminyum oksit nanopartikülleri ile *Galleria mellonella* larvalarında gerçekleşen melanizasyon seviyelerinde değişiklik (%)

4 saat* (% Ortalama $\pm$ Standart Hata)**					
Al ₂ O ₃ (ppm)	Total boncuk sayısı	Melanize Olmamış	Zayıf Melanizasyon	Orta Melanizasyon	Güçlü Melanizasyon
Kontrol	307	70,91 $\pm$ 2,14 ^a	8,02 $\pm$ 1,04 ^{ab}	6,19 $\pm$ 1,04 ^a	14,86 $\pm$ 1,05 ^a
50	270	69,63 $\pm$ 3,18 ^a	10,88 $\pm$ 1,41 ^b	7,16 $\pm$ 1,08 ^a	12,36 $\pm$ 1,71 ^{ab}
100	257	75,15 $\pm$ 1,98 ^{ab}	7,82 $\pm$ 1,21 ^{ab}	6,15 $\pm$ 1,15 ^a	10,93 $\pm$ 1,25 ^{ab}
500	273	77,09 $\pm$ 2,13 ^{ab}	6,47 $\pm$ 1,19 ^{ab}	6,49 $\pm$ 1,12 ^a	9,97 $\pm$ 1,29 ^{ab}
1000	304	81,60 $\pm$ 1,98 ^b	5,09 $\pm$ 0,89 ^a	5,71 $\pm$ 0,98 ^a	7,60 $\pm$ 1,40 ^b
df		4	4	4	4
F		4,31	3,44	0,25	3,95
Sig.		0,000	0,010	0,910	0,010

* Her veri üç kopya halinde 15 larvanın % "Ortalama $\pm$ Standart Hata" sını sembolize eder.

** Bir sütunda aynı harfi içeren ortalamalar (a-b) önemli ölçüde farklı değildir ($p < 0,05$; Tukey's HSD)

Orta derecede melanizasyon gösteren boncuk yüzdeleri 4 ve 24 saat sonra hiçbir grupta etkili değildi (Tablo 4.10). Boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra güçlü melanizasyon tepkisi 1000 ppm Al₂O₃ NP konsantrasyonunda $7,60 \pm 1,40$ olacak şekilde önemli ölçüde azaldı ($p < 0,05$; Tablo 4.9). 24 saatin sonunda ise bu bağışıklık tepkisi 500 ve 1000 ppm Al₂O₃ NP konsantrasyonlarında ($12,19 \pm 0,83$ ve $11,45 \pm 1,90$) önemli ölçüde azaldı ($p < 0,05$; Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra alüminyum oksit nanopartikülleri ile *Galleria mellonella* larvalarında gerçekleşen melanizasyon seviyelerinde değişiklik (%)

24 saat* (% Ortalama $\pm$ Standart Hata)**					
Al ₂ O ₃ (ppm)	Total boncuk sayısı	Melanize Olmamış	Zayıf Melanizasyon	Orta Melanizasyon	Güçlü Melanizasyon
Kontrol	260	45,16 $\pm$ 4,75 ^a	12,77 $\pm$ 1,06 ^a	11,79 $\pm$ 1,84 ^a	30,32 $\pm$ 3,08 ^a
50	284	47,63 $\pm$ 4,20 ^a	12,54 $\pm$ 1,32 ^{ab}	11,80 $\pm$ 1,44 ^a	28,04 $\pm$ 3,01 ^a
100	292	49,00 $\pm$ 3,93 ^a	13,73 $\pm$ 1,49 ^a	10,47 $\pm$ 1,17 ^a	26,82 $\pm$ 2,78 ^a
500	236	71,3 $\pm$ 1,51 ^b	8,04 $\pm$ 0,70 ^{bc}	8,51 $\pm$ 1,19 ^a	12,19 $\pm$ 0,83 ^b
1000	265	75,69 $\pm$ 3,33 ^b	5,71 $\pm$ 1,13 ^c	7,17 $\pm$ 1,09 ^a	11,45 $\pm$ 1,90 ^b
df		4	4	4	4
F		15,25	8,86	2,23	13,72
Sig.		0,000	0,000	0,070	0,000

* Her veri üç kopya halinde 15 larvanın % "Ortalama $\pm$ Standart Hata" sını sembolize eder.

** Bir sütunda aynı harfi içeren ortalamalar (a-c) önemli ölçüde farklı değildir (p<0,05; Tukey's HSD)

G. mellonella son dönem larvaları üzerinde PS NP'lerin melanizasyon tepkisi 4 ve 24 saat sonra birbirine benzer şekilde etkili oldu (Tablo 4.11 ve Tablo 4.12). PS NP uygulanan ve boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra 100 ppm grubunda %51,45 $\pm$ 3,78, 500 ppm grubunda %52,23 $\pm$ 4,11 ve 1000 ppm grubunda %62,08 $\pm$ 2,35 oranında artışlar tespit edildi (p<0,05). 24 saatin sonunda ise 500 ppm grubu %51,65 $\pm$ 2,62 ve 1000 ppm grubu %43,71 $\pm$ 3,85 oranlarında arttı (p<0,05). Zayıf ve orta melanizasyon tepkilerinde etkili bir değişiklik gözlenmedi ve iki saat diliminde de yüzde sayısal veriler birbirine benzer aralıklarda görüldü. PS NP'lerin 4 saat sonra güçlü melanizasyon yüzdeleri üzerindeki etkisi 100 ve 1000 ppm PS NP uygulanan grupta (sırasıyla %23,74 $\pm$ 2,4 ve %16,61 $\pm$ 2,36) önemli ölçüde etkili oldu ve bağışıklık tepkisi azaldı (p<0,05; Tablo 4.11). Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra PS NP'lerin etkisi 100, 500 ve 1000 ppm'de sırasıyla %25,95 $\pm$ 1,78, %27,19 $\pm$ 2,01 ve %24,80 $\pm$ 2,55 şeklinde azaldı (p<0,05; Tablo 4.12).

Tablo 4.11. Boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra polistiren nanopartikülleri ile *Galleria mellonella* larvalarında gerçekleşen melanizasyon seviyelerinde değişiklik (%)

4 saat* (% Ortalama ± Standart Hata)**					
PS (ppm)	Total boncuk sayısı	Melanize Olmamış	Zayıf Melanizasyon	Orta Melanizasyon	Güçlü Melanizasyon
Kontrol	312	35,26 ± 4,70 ^a	13,17 ± 1,71 ^a	12,04 ± 1,42 ^a	39,51 ± 3,20 ^a
50	291	41,52 ± 5,43 ^{ab}	9,98 ± 1,59 ^a	10,90 ± 1,07 ^a	37,59 ± 5,04 ^{ab}
100	289	51,45 ± 3,78 ^{abc}	12,23 ± 1,57 ^a	12,58 ± 1,39 ^a	23,74 ± 2,45 ^{bc}
500	309	52,23 ± 4,11 ^{bc}	9,88 ± 0,92 ^a	10,63 ± 1,33 ^a	27,25 ± 3,84 ^{abc}
1000	292	62,08 ± 2,35 ^c	10,36 ± 1,13 ^a	11,00 ± 1,30 ^a	16,61 ± 2,36 ^c
df		4	4	4	4
F		6,09	1,10	0,41	7,42
Sig.		0,000	0,360	0,800	0,000

* Her veri üç kopya halinde 15 larvanın % "Ortalama ± Standart Hata" sını sembolize eder.

** Bir sütunda aynı harfi içeren ortalamalar (a-c) önemli ölçüde farklı değildir (p<0,05; Tukey's HSD)

Tablo 4.12. Boncuk enjeksiyonundan 24 saat sonra polistiren nanopartikülleri ile *Galleria mellonella* larvalarında gerçekleşen melanizasyon seviyelerinde değişiklik (%)

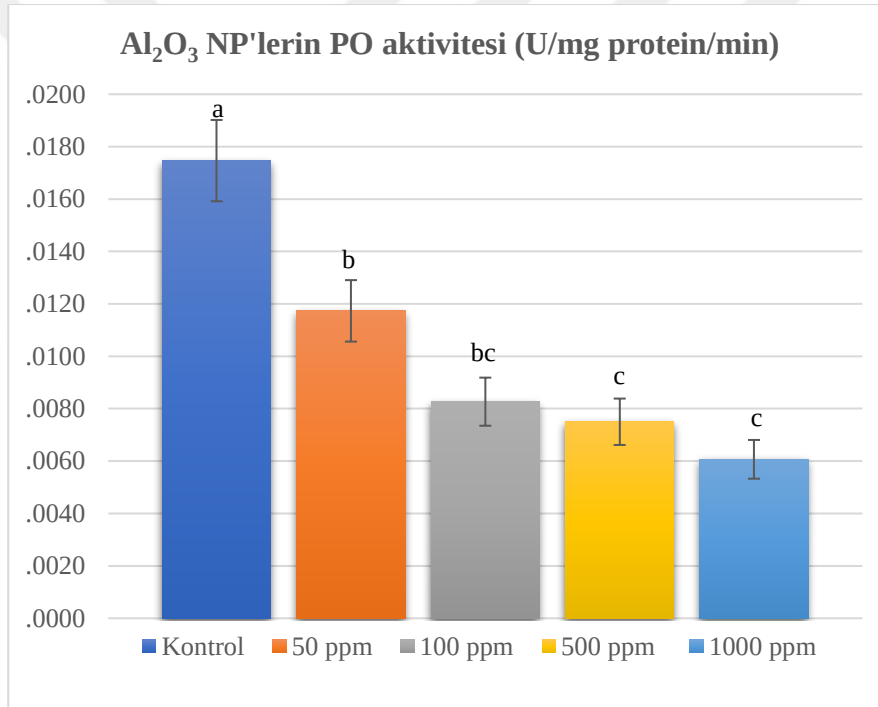
24 saat* (% Ortalama ± Standart Hata)**					
PS (ppm)	Total boncuk sayısı	Melanize Olmamış	Zayıf Melanizasyon	Orta Melanizasyon	Güçlü Melanizasyon
Kontrol	278	32,66 ± 2,82 ^a	13,33 ± 1,27 ^a	14,73 ± 1,10 ^a	39,27 ± 3,52 ^a
50	309	32,57 ± 3,13 ^a	11,13 ± 0,93 ^a	13,39 ± 1,17 ^a	42,89 ± 3,94 ^a
100	264	49,58 ± 2,45 ^a	12,00 ± 1,38 ^a	12,47 ± 1,18 ^a	25,95 ± 1,78 ^b
500	310	51,65 ± 2,62 ^b	11,06 ± 1,02 ^a	10,21 ± 0,95 ^a	27,19 ± 2,01 ^b
1000	270	43,71 ± 3,85 ^b	11,60 ± 1,24 ^a	12,53 ± 1,43 ^a	24,80 ± 2,55 ^b
df		4	4	4	4
F		11,39	0,884	1,962	8,495
Sig.		0,000	0,478	0,110	0,000

* Her veri üç kopya halinde 15 larvanın % "Ortalama ± Standart Hata" sını sembolize eder.

** Bir sütunda aynı harfi içeren ortalamalar (a-b) önemli ölçüde farklı değildir (p<0,05; Tukey's HSD)

4.7. Fenol Oksidaz Aktivitesi

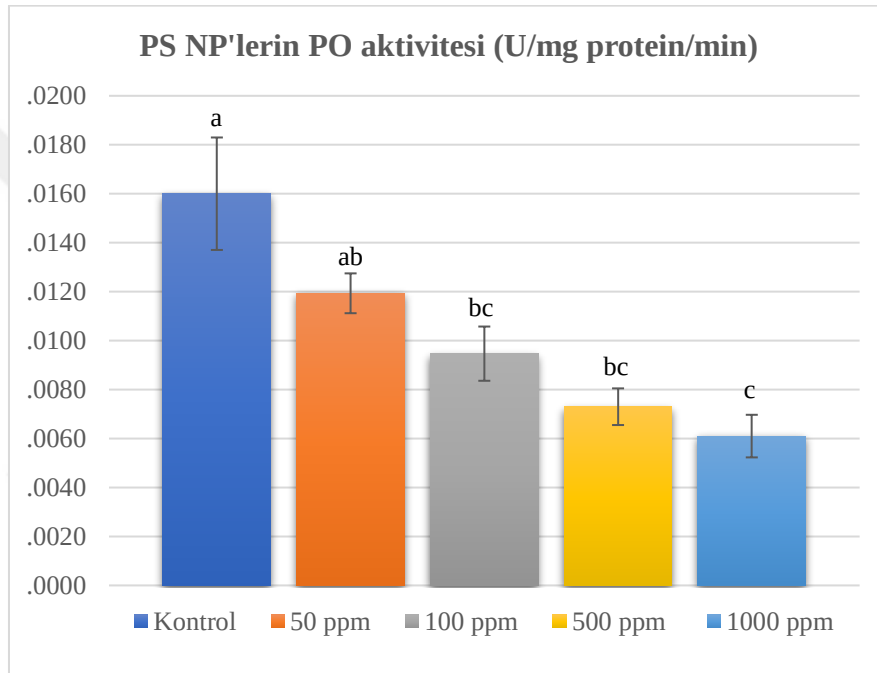
PO enzim aktivitesi değerlendirildiğinde, Al_2O_3 NP'lere maruz kalmayan grubun ortalaması $0,0175 \pm 0,0015$ U/mg protein/dk şeklinde bulundu. 50 ppm Al_2O_3 NP'ler larvalarda PO aktivitesini önemli ölçüde azalttı ($p < 0,05$; $0,0117 \pm 0,00117$ U/mg protein/dk; Şekil 4.12). 100 ppm grubunu oluşturan larvalarda ise enzim aktivitesi $0,0083 \pm 0,00092$ U/mg protein/dk şeklindeydi. Öte yandan yüksek konsantrasyonları temsil eden 500 ve 1000 ppm Al_2O_3 NP uygulanan gruplarda enzim aktivitesi azaldı (F:4; df:18,2; sig:0,000<0,05). Bu gruplarda dk başına PO aktivitesi sırasıyla $0,0075 \pm 0,00088$ ve $0,0061 \pm 0,00074$ U/mg protein şeklinde gerçekleşti ($p < 0,05$). Özellikle 1000 ppm Al_2O_3 NP grubunda enzim aktivitesi %65 oranında azaldı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Alüminyum oksit nanopartiküllerin *Galleria mellonella* larvalarındaki fenol oksidaz aktivitesi üzerindeki etkisi. Absorbans ELISA mikroploka okuyucuda 490 nm'de 30 dk boyunca 5 dk aralıklarla ölçüldü. Fenol oksidaz aktivitesi absorbans birimi U/mg protein/dk olarak verildi. Veriler toplam 15 larvanın "Ortalama $\pm$ Standart Hata"sı şeklinde gösterildi. Grafikte farklı harflerle gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$; Tek yönlü ANOVA, Tukey's HSD)

PS NP uygulanmayan grupta PO aktivitesinin ortalaması $0,0160 \pm 0,0023$ U/mg protein/dk olarak kaydedildi. 50 ppm PS NP grubunda ($0,0119 \pm 0,00081$ U/mg

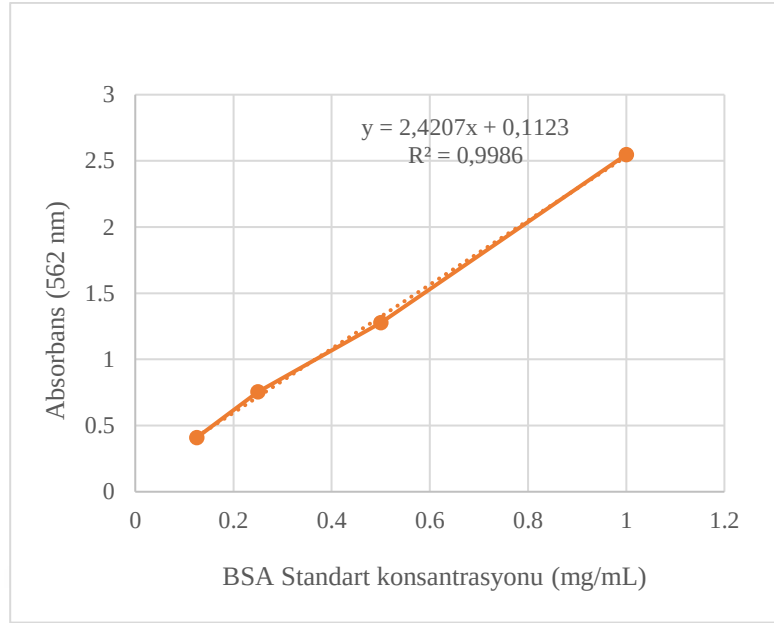
protein/dk) etki göstermeye başladığı ve artan PS NP konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.13). 100 ve 500 ppm gruplarında enzim aktivitesi önemli derecede azaldı ($p < 0,05$) ve iki grup birbirine yakın değerler (sırasıyla $0,0095 \pm 0,00111$ ve $0,0073 \pm 0,00075$ U/mg protein/dk) gösterdi. Enzim aktivitesinde en yüksek düşüşü gösteren grup 1000 ppm PS NP'ler ($0,0061 \pm 0,00087$ U/mg protein) ile muamele edilen grup oldu ($F:4$; $df:9,6$; $sig:0,000 < 0,05$). PO aktivitesi, en yüksek PS NP konsantrasyonuna sahip 1000 ppm grubunda yaklaşık %62 oranında azaldı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Polistiren nanopartiküllerin *Galleria mellonella* larvalarındaki fenol oksidaz aktivitesi üzerindeki etkisi. Absorbans ELISA mikroparka okuyucuda 490 nm’de 30 dk boyunca 5 dk aralıklarla ölçüldü. Fenol oksidaz aktivitesi absorbans birimi U/mg protein/dk olarak verildi. Veriler toplam 15 larvanın “Ortalama $\pm$ Standart Hata”sı şeklinde gösterildi. Grafikte farklı harflerle gösterilen gruplar anlamlıdır ($p < 0,05$; Tek yönlü ANOVA, Tukey’s HSD)

4.8. Protein Tayini

Çeşitli konsantrasyonlarda (1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/mL) hazırlanan bovin serum albümin (BSA) standartlarından oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.14’de gösterildi. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen BSA’ya ait R^2 değeri 0,9986 şeklinde bulundu. Elde edilen eğri denklemi protein miktarlarının hesaplanmasında kullanıldı.



Şekil 4.14. Bovin serum albümine ait standart eğri

PO enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan protein konsantrasyonları Tablo 4.13’de gösterildi. Tüm deney gruplarında protein miktarları birbirine yakın değerler gösterdi ve gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Tablo 4.13. Alüminyum oksit ve polistiren nanopartikül uygulanan deney gruplarında protein konsantrasyonları (mg/mL)

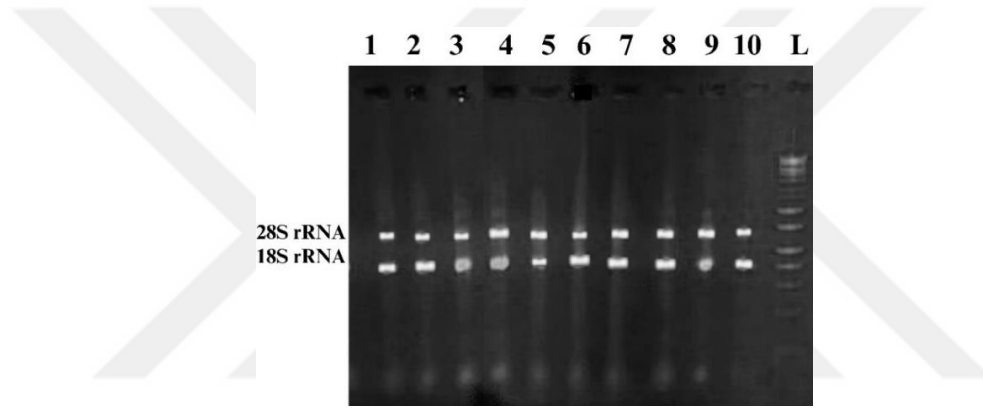
Deney Grupları	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	
	Al ₂ O ₃ NP *	PS NP *
Kontrol	5,63 ± 0,73 ^a	6,18 ± 0,46 ^a
50 ppm	5,38 ± 0,51 ^a	6,12 ± 0,35 ^a
100 ppm	6,39 ± 0,45 ^a	7,01 ± 0,34 ^a
500 ppm	6,10 ± 0,48 ^a	5,84 ± 0,34 ^a
1000 ppm	6,74 ± 0,46 ^a	6,61 ± 0,48 ^a
df	4	4
F	1,04	1,28
sig	0,39	0,28

* Her veri üç paralel halinde 15 larvanın “Ortalama ± Standart Hata”sını sembolize eder (p>0,05; Tek yönlü ANOVA, Tukey’s HSD)

4.9. Antimikrobiyal Peptitlerin Gen Ekspresyon Analizleri

4.9.1. RNA İzolatlarının Konsantrasyonları, Safılıkları ve Jel Görüntüleri

Agaroz jelde (%1'lik) yürütülen RNA'ların örnek görüntüsü Şekil 4.15'de verildi. Konsantrasyonlar (ng) 1 µL RNA izolatu içerisinde bulunan RNA miktarını ifade etmektedir. Ayrıca $A_{260/230}$ RNA saflıklarının 2,0-2,2 ve $A_{260/280}$ saflıklarının ise 1,8-2,0 arasında değişen değerlerin kullanılmasına dikkat edildi. Şekil 4.15'de gösterilen numaralar Al_2O_3 (1-5; sırasıyla Kontrol, 50, 100, 500 ve 1000 ppm) ve PS (6-10; sırasıyla Kontrol, 50, 100, 500 ve 1000 ppm) NP'leri oluşturan tüm gruplardan birer örnek olacak şekilde verildi.



Şekil 4.15. RNA izolatlarının örnek agaroz jel görüntüsü. L: DNA işaretleyici (Ladder)

4.9.2. RT-qPCR Analizleri

Birinci (ebeveyn; F0) nesil larvalarda belirlenen sonuçlara göre kontrol geni olarak kullanılan β -aktin geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50, 100, 500 ve 1000 ppm'lik Al_2O_3 NP doz uygulanması sonucunda sırasıyla 1,53, 1,48, 1,55 ve 1,9 kat artış gözlemlendi (Tablo 4.14). 50, 100, 500 ve 1000 ppm'lik Al_2O_3 NP konsantrasyonlarında *G. mellonella*'da bir demir depolama ve taşıma proteini olan transferrin ekspresyonunun sırasıyla 2,12, 4,36, 3,77 ve 3,29 kat arttığı gözlemlendi (Tablo 4.14). Genellikle mantar enfeksiyonunda ekspresyon miktarlarında farklılık gözlenen galiyomisin geninde mRNA ekspresyonu artan dozlara göre sırasıyla 1,8, 2,5, 1,69 ve 2,93 kat azaldı (Tablo 4.14). Çevresel stres ve inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenen sinyallerin iletilmesinde görevli p38 MAP kinaz gen ekspresyonu artan Al_2O_3 NP dozları ile azaldı (50 ppm; 5,83, 100 ppm; 2,58, 500 ppm; 3,45 ve 1000 ppm; 2,14 kat; Tablo 4.14). 1000

ppm Al₂O₃ NP grubunda galiyomisin gen ekspresyonundaki azalma ve 50-100 ppm Al₂O₃ NP doz uygulaması sonucu p38 MAP kinaz geninde mRNA ekspresyonundaki azalmalar önemliydi (p<0,05; Şekil 4.16).

Tablo 4.14. Birinci (ebeveyn) nesilde alüminyum oksit nanopartiküllerinin gen ifadelerinde kat değişimine etkisi

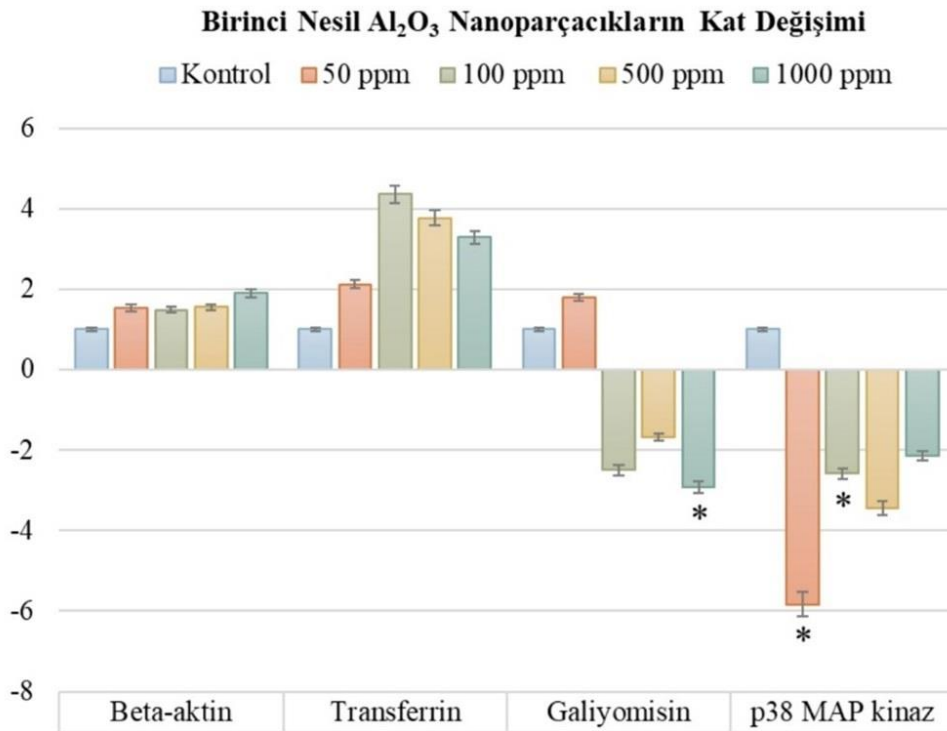
Gen Bölgeleri	50 ppm Al ₂ O ₃		100 ppm Al ₂ O ₃		500 ppm Al ₂ O ₃		1000 ppm Al ₂ O ₃	
	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P
β-aktin	1,53	0,253	1,48	0,299	1,55	0,160	1,90	0,139
Transferrin	2,12 ^a	0,261	4,36 ^a	0,260	3,77 ^a	0,143	3,29 ^a	0,088
Galiyomisin	1,80	0,114	-2,50 ^b	0,129	-1,69	0,678	-2,93 ^{b,*}	0,029
p38MAPK	-5,83 ^{b,*}	0,007	-2,58 ^{b,*}	0,001	-3,45 ^b	0,073	-2,14 ^b	0,091

^a Gen ekspresyonunda artma; 2'den büyük kat değişimi ve kat düzenlemesi değerleri "a" ile gösterildi.

^b Gen ekspresyonunda azalma; 0,5'ten küçük kat değişimi değerleri ve -2'den küçük kat düzenlemesi değerleri "b" ile gösterildi.

^c Kat değişimi (2^(-ΔΔCT)) deney gruplarındaki normalleştirilmiş gen ifadesinin (2^(-ΔCT)) kontrol grubundaki normalleştirilmiş gen ifadesine (2^(-ΔCT)) bölünmesiyle elde edildi.

* Kontrol grubuna göre p<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görüldü.



Şekil 4.16. Birinci nesilde alüminyum oksit nanopartiküllerinin antimikrobiyal peptitler ile ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar β-aktin geni ile normalize

edildi ve kontrol gruplarının değeri “1” olarak alındı. Üç farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak veriler hesaplandı. *; Kontrol grubuna göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık görüldü

İkinci (yavru; F1) nesil larvalarda belirlenen Al_2O_3 NP dozlarının uygulanması sonucunda β -aktin geninin ekspresyon düzeyleri 50, 100, 500 ve 1000 ppm gruplarında sırasıyla 1,34, 1,58, 1,44 ve 1,5 kat arttı (Tablo 4.15). Transferrin geninde mRNA ekspresyonu 50, 100, 500 ve 1000 ppm konsantrasyonlarında sırasıyla 2,66, 4,27, 3,27 ve 2,95 kat arttı (Tablo 4.15).

Galiyomisin ekspresyonu artan Al_2O_3 NP dozlarına (50, 100, 500 ve 1000 ppm) göre sırasıyla 1,69, 2,67, 2,24 ve 1,91 kat azaldı (Tablo 4.15). p38 MAP kinaz gen ekspresyonu 50 ppm grubunda 6,01, 100 ppm grubunda 2,53, 500 ppm grubunda 2,1 ve 1000 ppm grubunda ise 2,38 kat azaldı (Tablo 4.15). Transferrin geninde ekspresyon seviyeleri 500 ve 1000 ppm grubundaki artış; p38 MAP kinaz geninde 50 ve 100 ppm gruplarında gerçekleşen azalmalar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$; Şekil 4.17).

Tablo 4.15. İkinci (yavru) nesilde alüminyum oksit nanopartiküllerinin gen ifadelerinde kat değişimine etkisi

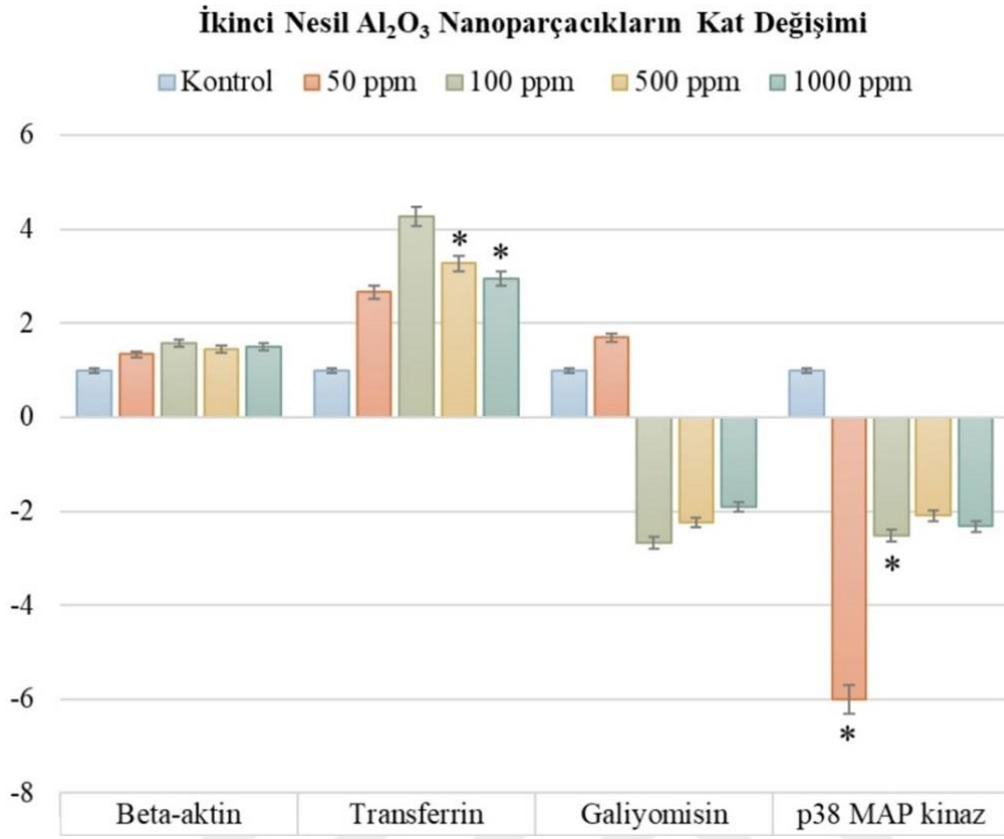
Gen Bölgeleri	50 ppm Al_2O_3		100 ppm Al_2O_3		500 ppm Al_2O_3		1000 ppm Al_2O_3	
	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P
β-aktin	1,34	0,095	1,58	0,101	1,44	0,102	1,50	0,224
Transferrin	2,66 ^a	0,141	4,27 ^a	0,129	3,27 ^{a,*}	0,002	2,95 ^{a,*}	0,011
Galiyomisin	1,69	0,225	-2,67 ^b	0,136	-2,24 ^b	0,285	-1,91	0,265
p38 MAPK	-6,01 ^{b,*}	0,022	-2,53 ^{b,*}	0,047	-2,10 ^b	0,719	-2,32 ^b	0,079

^a Gen ekspresyonunda artma; 2'den büyük kat değişimi ve kat düzenlemesi değerleri “a” ile gösterildi.

^b Gen ekspresyonunda azalma; 0,5'ten küçük kat değişimi değerleri ve -2'den küçük kat düzenlemesi değerleri “b” ile gösterildi.

^c Kat değişimi ($2^{(-\Delta\Delta CT)}$) deney gruplarındaki normalleştirilmiş gen ifadesinin ($2^{(-\Delta CT)}$) kontrol grubundaki normalleştirilmiş gen ifadesine ($2^{(-\Delta CT)}$) bölünmesiyle elde edildi.

* Kontrol grubuna göre $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görüldü.



Şekil 4.17. İkinci (yavru) nesilde alüminyum oksit nanopartiküllerinin antimikrobiyal peptitler ile ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar β -aktin geni ile normalize edildi ve kontrol gruplarının değeri “1” olarak alındı. Üç farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak veriler hesaplandı. *; Kontrol grubuna göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık görüldü

PS NP dozlarının uygulanması sonucunda ebeveyn larvalarda belirlenen kontrol geni β -aktin ekspresyon düzeylerinde 50, 100, 500 ve 1000 gruplarında sırasıyla 1,04, 1,11, 1,09 ve 1,41 kat artış gözlemlendi (Tablo 4.16). *G. mellonella*'da demir depolama ve taşınmasında önemli transferrin gen ifadesinin artan konsantrasyonlarında sırasıyla 1,71, 1,73, 1,17 ve 1,2 kat azaldığı gözlemlendi (Tablo 4.16). Aynı PS dozlarında galiyomisin ekspresyonu ise sırasıyla 1,67, 1,19, 3,18 ve 3,06 kat arttı (Tablo 4.16). p38 MAP kinaz gen ekspresyonu artan PS NP dozları ile azaldı (50 ppm; 1,02, 100 ppm; 2,28, 500 ppm; 2,94 ve 1000 ppm; 3,61 kat; Tablo 4.16). Transferrin geninde 50 ppm grubundaki azalma; galiyomisin geninde 500 ppm grubundaki artış; p38 MAP kinaz geninde ise 100, 500 ve 1000 ppm PS NP doz uygulaması ile gerçekleşen azalmalar istatistiksel olarak önemliydi ($p < 0,05$; Şekil 4.18).

Tablo 4.16. Birinci (ebeveyn) nesilde polistiren nanopartiküllerinin gen ifadelerinde kat değişimine etkisi

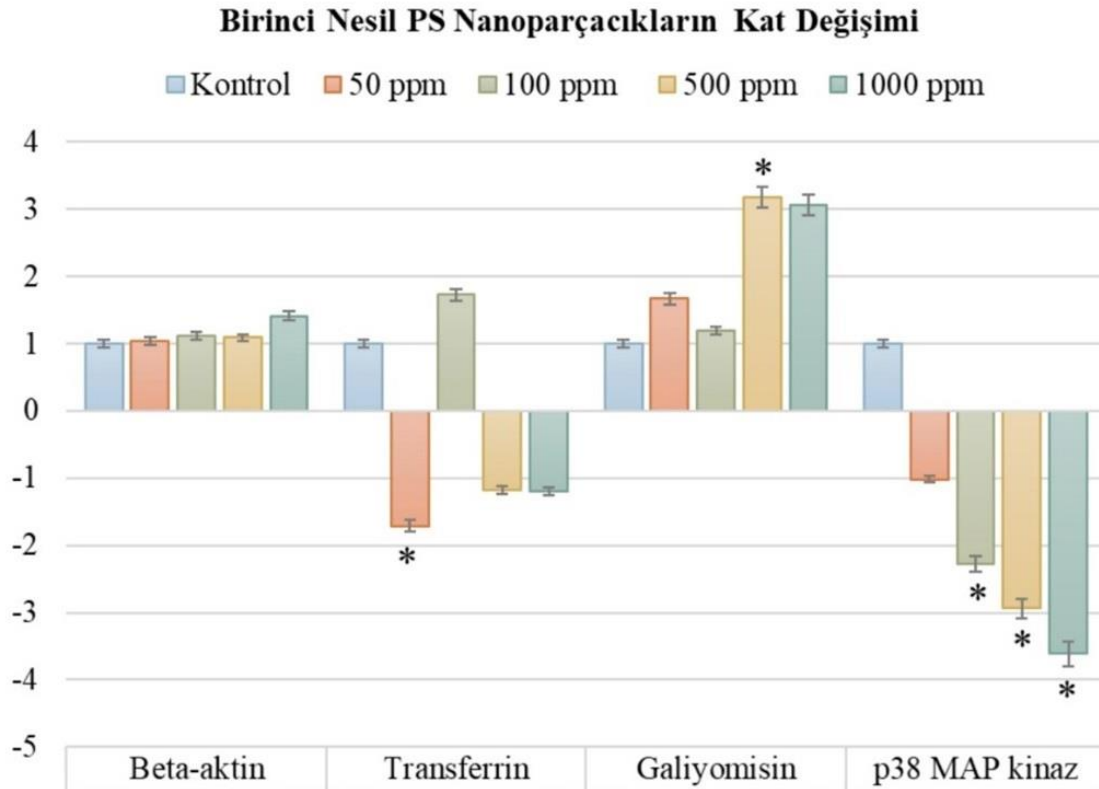
Gen Bölgeleri	50 ppm PS		100 ppm PS		500 ppm PS		1000 ppm PS	
	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P
β-aktin	1,04	0,682	1,11	0,486	1,09	0,287	1,41	0,329
Transferrin	-1,71 ^{b,*}	0,047	1,73	0,143	-1,17	0,622	-1,20	0,533
Galiyomisin	1,67	0,157	1,19	0,461	3,18 ^{a,*}	0,005	3,06 ^a	0,115
p38 MAPK	-1,02	0,921	-2,28 ^{b,*}	0,029	-2,94 ^{b,*}	0,010	-3,61 ^{b,*}	0,012

^a Gen ekspresyonunda artma; 2'den büyük kat değişimi ve kat düzenlemesi değerleri "a" ile gösterildi.

^b Gen ekspresyonunda azalma; 0,5'ten küçük kat değişimi değerleri ve -2'den küçük kat düzenlemesi değerleri "b" ile gösterildi.

^c Kat değişimi ($2^{(-\Delta\Delta CT)}$) deney gruplarındaki normalleştirilmiş gen ifadesinin ($2^{(-\Delta CT)}$) kontrol grubundaki normalleştirilmiş gen ifadesine ($2^{(-\Delta CT)}$) bölünmesiyle elde edildi.

* Kontrol grubuna göre $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görüldü.



Şekil 4.18. Birinci (ebeveyn) nesilde polistiren nanopartiküllerinin antimikrobiyal peptitler ile ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar β-aktin geni ile normalize edildi ve kontrol gruplarının değeri "1" olarak alındı. Üç farklı zamanda

gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak veriler hesaplandı. *; Kontrol grubuna göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık görüldü

Yavru nesil larvalarda PS NP dozlarının uygulanması sonucunda β -aktin geninin ekspresyon düzeyleri 50, 100, 500 ve 1000 ppm gruplarında sırasıyla 1,08, 1,36, 1,41 ve 1,5 kat arttı (Tablo 4.17). Transferrin geninde ekspresyon aynı PS NP konsantrasyonlarında sırasıyla 1,71, 1,29, 1,2 ve 2,24 kat azaldı (Tablo 4.17; Şekil 4.19).

Galiyomisin mRNA ekspresyonu artan PS NP dozlarına göre sırasıyla 1,24, 1,84, 2,45 ve 2,2 kat artış gösterdi (Tablo 4.17). p38 MAP kinaz gen ekspresyonu ise 50 ppm PS NP ile 1,27 kat, 100 ppm NP ile 3,23 kat, 500 ppm NP ile 2,87 kat ve 1000 ppm NP ile ise 1,48 kat azaldı (Tablo 4.17).

Transferrin geninde 1000 ppm PS grubundaki azalma; galiyomisin geninde 500 ppm grubundaki artış; p38 MAP kinaz geninde ise 100 ve 500 ppm gruplarında gerçekleşen azalmalar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$; Şekil 4.19).

Tablo 4.17. İkinci (yavru) nesilde polistiren nanopartiküllerinin gen ifadelerinde kat değişimine etkisi

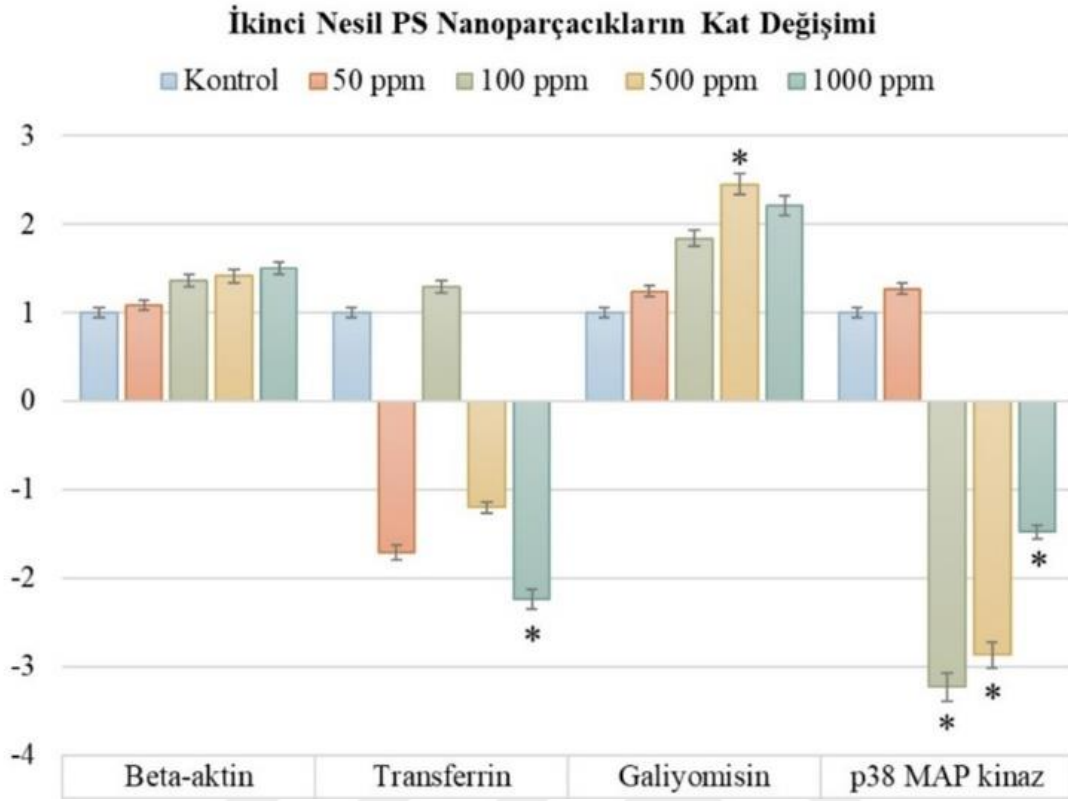
Gen Bölgeleri	50 ppm PS		100 ppm PS		500 ppm PS		1000 ppm PS	
	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P	Kat değişimi ^c	P
β-aktin	1,08	0,763	1,36	0,299	1,41	0,255	1,50	0,337
Transferrin	-1,71	0,106	1,29	0,343	-1,2	0,271	-2,24 ^{b, *}	0,038
Galiyomisin	1,24	0,196	1,84	0,199	2,45 ^{a, *}	0,023	2,20 ^a	0,173
p38 MAPK	1,27	0,191	-3,23 ^{b, *}	0,002	-2,87 ^{b, *}	0,003	-1,48	0,043

^a Gen ekspresyonunda artma; 2'den büyük kat değişimi ve kat düzenlemesi değerleri "a" ile gösterildi.

^b Gen ekspresyonunda azalma; 0,5'ten küçük kat değişimi değerleri ve -2'den küçük kat düzenlemesi değerleri "b" ile gösterildi.

^c Kat değişimi ($2^{(-\Delta\Delta CT)}$) deney gruplarındaki normalleştirilmiş gen ifadesinin ($2^{(-\Delta CT)}$) kontrol grubundaki normalleştirilmiş gen ifadesine ($2^{(-\Delta CT)}$) bölünmesiyle elde edildi.

* Kontrol grubuna göre $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görüldü.



Şekil 4.19. İkinci (yavru) nesilde polistiren nanopartiküllerinin antimikrobiyal peptitler ile ilişkili genlerinin mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar β -aktin geni ile normalize edildi ve kontrol gruplarının değeri “1” olarak alındı. Üç farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak veriler hesaplandı. *; Kontrol grubuna göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık görüldü

5. TARTIŞMA

Zeta potansiyeli NP süspansiyonlarının kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ve NP'lerin yüzey yükü ile ilişkili çok önemli bir faktördür. Kolloidal bir sistemdeki partiküller büyük negatif veya pozitif zeta potansiyeline sahip olduğunda, aralarındaki itme kuvvetleri toplanmayı önler. Buna karşılık NP'ler düşük yüzey yüküne sahip olduğunda, itme kuvvetlerinin azalması toplanmaya neden olur. Bu bağlamda zeta potansiyel değerleri +25 mV'den büyük veya -25 mV'den düşük olan nanopartikül süspansiyonları genellikle yüksek kararlı süspansiyonlar oluşturur (Gorbe ve diğ., 2016; Sankar ve diğ., 2014; Harshiny ve diğ., 2015). CuO NP'lerin zeta potansiyeli $-17,1 \pm 0,4$ mV olarak belirlenmiştir. Bu NP'ler küçük ve büyük agregatlar içeren süspansiyonlar üreterek toplanma eğilimi göstermiştir (Tunçsoy ve diğ., 2021). Zorlu ve diğerleri (2018), 25 nm'den küçük TiO₂ NP'lerin 23,0 mV zeta potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir. Muhammad ve diğerleri (2022), CuO ve ZnO NP'leri için zeta potansiyel değerlerini sırasıyla $-24,3 \pm 4,41$ ve $11,9 \pm 5,36$ şeklinde bulmuşlardır. Her iki NP'nin zeta potansiyel değerlerinin düşük kararlılığa işaret ettiğini bildirmişlerdir (Muhammad ve diğ., 2022). Çalışmamızda Al₂O₃ NP'lerin zeta potansiyeli 20,3 mV olarak tespit edildi. TiO₂ NP'ler gibi diğer metal oksit NP'lerle karşılaştırıldığında bu partiküllerin kısa süreli kararlılık gösterdiği gözlemlendi. Bu partiküller sıvı ortamlarda kısa süreli topaklanmaya neden olduğu için canlı sistemlerde dokularda ve hücrelerde topaklanabilir ve toksisitenin artmasına neden olabilir. Hatta bağışıklık sistemindeki hücrelerin fonksiyonunu baskılayarak apoptoz ve nekroz gibi süreçleri hızlandırabileceği düşünülebilir.

Böcekler üzerine yapılan çalışmaların çoğu mikro ve nano PS'ler için zeta potansiyel değerleri verilmemektedir. Bununla birlikte toprak enzimlerinin fonksiyonel çeşitliliğinin araştırıldığı bir çalışmada, elde edilen nano PS'lerin zeta potansiyel değerinin $-43,3 \pm 17,5$ mV olduğu bildirilmiştir (Awet ve diğ., 2018). Çalışmamızda ise PS NP'lerin zeta potansiyel değeri -19,3 mV olarak belirlendi. Bu değer -5 ila -25 mV aralığında yer aldığından ve negatif düşük zeta potansiyeline sahip olduğundan, partiküller arasında az da olsa itici bir kuvvet oluşturarak NP'lerin toplanmasını önler ve onları daha kararlı tutar. Elde edilen nano PS'lerin SEM görüntüleri de topaklanma oluşmadığını göstermiştir. Al₂O₃ NP'lerin zeta potansiyeline bakıldığında, muhtemelen

kısa vadeli stabilite ve topaklanma eğilimi açısından toksisiteyi arttırabileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak Al_2O_3 NP'lerde olduğu gibi nanoparçacıkların toplanma eğilimi canlıların doku ve organlarında biyoakümülyasyona neden olabileceğini düşündürmektedir.

Nanoparçacıkların toksisite analizleri için toksik konsantrasyonların tespit edilmesi ve güvenli dozların belirlenmesi oldukça kritik öneme sahiptir. Zorlu ve diğerleri (2018), 100, 500, 1000, 3000 ve 5000 ppm gibi farklı konsantrasyonlarda TiO_2 NP'lerin *G. mellonella*'ya besinle verilerek toksisite testlerini gerçekleştirmişlerdir (Zorlu ve diğ., 2018). CuO NP'ler 10, 100, 1000 ve 10.000 $\mu g/mL$ gibi konsantrasyonlarda sentetik besinle *G. mellonella*'ya uygulanmış ve deneysel konsantrasyonlar belirlenmiştir (Tunçsoy ve diğ., 2021). Metal oksit NP'lerin *G. mellonella* larvalarında toksisite testlerinde özellikle TiO_2 için 500 ve 1000 ppm (Zorlu ve diğ., 2018) ve CuO için 1000 $\mu g/mL$ ve LC_{10} (Tunçsoy ve diğ., 2021) şeklinde olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise Al_2O_3 NP'lerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki toksik etkileri 500 ve 1000 ppm'de gözlemlendi ve diğer metal oksit konsantrasyonları ile benzer sonuçlar ortaya koydu. Diğer taraftan Ag NP'lerin toksisitesini belirlemek için, artan Ag NP konsantrasyonları (25, 35, 50, 75, 85 ve 100 mg/kg larva) ile bir toksisite deneyi gerçekleştirilmiş ve Ag NP'lerin *G. mellonella* için toksisite konsantrasyonu (LD_{50} değeri) 68,70 mg/kg larva olarak bildirilmiştir (Thomaz ve diğ., 2020). Toksisite için değerlendirilen bu konsantrasyon, diğer metal oksit NP'lerin toksisite testlerine kıyasla daha etkilidir.

Nanoparçacık endüstrilerinde Al_2O_3 ve PS kullanımının artması ve çevreye karışmaları “nanokirletici” olabilme şüphesini arttırmaktadır. Canlılar çevresel kirleticilere uzun süre maruz kalabilir ve oluşturabileceği etkiler sonraki nesillere aktarılabilmektedir. Nanopartiküllerin özellikle sonraki jenerasyona aktarılan DNA stabilitesi üzerindeki etkilerine dikkat edilmelidir. Günümüzde genetik ve epigenetik modifikasyonları temel alan araştırmalar için çok nesilli çalışmalar önem taşımaktadır. Bu noktada *G. mellonella* gibi model böcekler önemli bir yere sahiptir. Birbirini takip eden jenerasyonların incelenmesi, araştırılan parametrenin doğası ile birlikte incelenen jenerasyonların özellikleri hakkında da değerli bilgiler sağlayabilmektedir (Flasz ve diğ., 2023). Nanokirleticilerin çoklu veya nesiller arası etkilerinin yavrularda epigenetik modifikasyonlara neden olabileceği düşüncesi ile birlikte, çalışmamızda iki nesilde

global DNA metilasyon seviyelerindeki değişiklikleri ve sonraki jenerasyona aktarımını araştırdık. Bu amaçla Al₂O₃ ve PS NP uygulanan *G. mellonella* larvalarında iki nesilde global DNA metilasyon seviyelerindeki değişiklikleri inceledik.

Global DNA metilasyonunun omurgasızlar arasında farklılık gösterebileceği belirtilmiştir. Sitozin DNA metilasyonu çok sayıda ökaryotik organizmada gösterilmiş ve insan hastalıklarında önemli bir rol oynadığı ortaya koyulmuştur (Field ve diğ., 2004). DNA metilasyonunun işlevi omurgalılarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir, ancak böceklerdeki metilasyon araştırmaları çok yenidir (Field ve diğ., 2004). Meyve sineği *D. melanogaster*'ın genel metilasyon seviyesi oldukça düşüktür, sitozin nükleotitlerinin %1'inden azı metillenmiştir, en yüksek DNA metilasyon seviyelerinin erken embriyolarda görüldüğü bildirilmiştir (Lyko, 2001). Lahana güvesi *Mamestra brassicae*'nın larva ve yetişkin dokularından ve *in vitro* hücrelerinden izole edilen genomik DNA üzerinde yapılan HPLC analizi, 5-metilsitozin içeriğinin yaklaşık %10 olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle lahana güvesinin DNA metilasyon seviyesinin böceklerde bildirilen en yüksek seviyeyi temsil ettiği ve omurgalılarınkine benzediği belirtilmiştir (Mandrioli ve Volpi, 2003). Çömlek kurdu *Enchytraeus crypticus*'da ise global DNA metilasyon oranlarının %1,41 olduğu belirtilmiştir (Noordhoek ve diğ., 2018). Literatürde böceklerde gerçekleşen global DNA metilasyon aralığının genellikle %0-3 oranlarında olduğu belirtilmiştir (Field ve diğ., 2004). Ancak, lahana güvesinde belirtilen %10'luk metilasyon seviyeleri bu aralığın üzerindedir. Kullandığımız model *G. mellonella* larvalarında NP uygulanmayan gruplarda 1000 ng genomik DNA'da 5m-dCMP konsantrasyonu ortalama 49,1 ng olduğu tespit edildi. Bu durum normal bir *G. mellonella* larvasında yaklaşık %4,9 oranında DNA metilasyonu gerçekleştiğini göstermektedir ve bu orandaki metilasyon seviyeleri bu model organizmada DNA metilasyonu çalışmaları için benzersiz bir profil oluşturmaktadır. Bununla birlikte Özbek ve diğerleri (2020), *G. mellonella*'nın pupal formunda 5-metilsitozin modifikasyonunun %3 olduğunu bildirmişlerdir. *G. mellonella*'da larval ve pupal formda global DNA metilasyon seviyelerinin belirlenmesinin gelecekte yapılacak araştırmaların önünü açacağını düşünmekteyiz. Bu modelde gerçekleştirilecek araştırmaların çok nesilli ve epigenetik mekanizmalar bakımından incelenmesi amacıyla kullanımının son derece önemli ve uygun olduğu görölmektedir.

Metalik, metal oksit mikro ve nanoparçacıklarla ilgili ve çok nesilli çalışmalar literatürde oldukça sınırlı kalmıştır. Özellikle omurgasızlarda sadece birkaç çalışma nanoparçacık kaynaklı global DNA metilasyonunu ve nesil aktarımını incelemiştir (Bicho ve diğ., 2020; Wamucho ve diğ., 2023). Beş nesil boyunca CuO NP uygulanan model tür çömlek kurdu *E. crypticus* üzerinde global DNA metilasyonu için gen ifadeleri RT-qPCR ile değerlendirilmiştir (Bicho ve diğ., 2020). Organizmalar beş ardışık nesil ve temiz ortama aktarıldıktan sonra iki nesil, toplam 224 günde yedi nesil süresince yetiştirilmiştir. EC₁₀ ve EC₅₀ konsantrasyonunda hayvanlarda CuO NP'lerin etkisi ile global DNA metilasyonunu ortalama %8 oranında arttırdığı bildirilmiştir. Temiz toprağa aktarılan son iki nesildeki metilasyondaki fark %4 ve %5 olmuştur (Bicho ve diğ., 2020). Metilasyon oranı ilk beş nesilde fazla görülürken temiz ortamda beslenen larvalarda daha düşük seviyelerde gözlemlenmiştir. Çalışmamızda iki nesilde de Al₂O₃ NP'lerin global DNA metilasyonunu arttırdı; ancak NP bulunmayan ortamda beslenen ikinci nesildeki metilasyon oranları sayısal olarak ebeveynlere göre daha düşük değerler gösterdi. Ebeveyn larvaları oluşturan 50 ve 100 ppm gruplarında ortalama %11,15'lik bir artış saptanırken, ikinci nesilde ortalama %5,3'lük bir artış görüldü. Araştırmacıların elde ettiği CuO NP'lerin temiz topraklara aktarılan ve iki nesil yetiştirilen organizmalarda bile sitozin bazında gerçekleşen global DNA metilasyonundaki yükselme çalışmamızdaki ebeveyn ve yavru nesillerden elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Ancak, ikinci nesillerde 50 ve 100 ppm gruplarında ebeveynlere göre metilasyon artışı neredeyse yarı yarıya azaldı. CuO NP uygulanan çalışmada ise temiz ortamdaki hayvanlarda ilk beş nesle göre %3-4'lük bir azalma belirtilmiştir. Bu durum CuO NP'ler için EC₁₀ ve EC₅₀ konsantrasyonlarının daha etkili olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte kullandığımız Al₂O₃ NP'lerin 500 ppm uygulaması sonucu metilasyona etkileri ise birinci nesilde %15 ve ikinci nesilde %15,8 olarak bulundu. En yüksek konsantrasyonu oluşturan 1000 ppm Al₂O₃ NP gruplarında %23,1 (birinci nesilde) ve %18,4 (ikinci nesilde) artış gözlemlendi. İlginç bir şekilde yavru larvalarda DNA metilasyonu aktarımının en yüksek oranda gözlemlendiği deney grubu 500 ppm'dir. Bu deney grubu epigenetik modifikasyon aktarımının en etkili Al₂O₃ NP konsantrasyonu olduğunu gösterdi. Diğer konsantrasyonlarda temiz ortamda yetiştirilen sonraki jenerasyonlarda metilasyon azalırken, 500 ppm Al₂O₃ NP konsantrasyonu birinci jenerasyona göre ikinci jenerasyonda global DNA metilasyonunu %0,8 artırdı.

Bu ilginç artış oranı, metilasyon mekanizmasının düzenlenmesinde DNMT'ler gibi yardımcı faktörlerin transkripsiyon seviyelerindeki değişikliklerin etkili olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Dolayısıyla metilasyon mekanizmasının düzenlenmesi için diğer yardımcı faktörlerin olabileceği göz önünde bulundurulabilir. Özetle hem CuO hem de Al₂O₃ NP'lerin DNA üzerindeki sitozinlerin metillenmesine neden olduğu ve her jenerasyonda NP'lere maruz kalınmasa dahi nesiller arası epigenetik aktarımın gerçekleşebileceği gösterilmektedir. Aynı zamanda CuO NP'ler ortalama %8'lik bir metilasyon farkı oluştururken Al₂O₃ NP uygulanan en yüksek konsantrasyonda bu oranın iki katından fazla (%23,1) fark oluşturduğu görülmektedir. CuO ve Al₂O₃ NP'lerin oluşturduğu bu etkiler *E. crypticus* ve *G. mellonella* türlerinin normal bireyleri arasında gerçekleşen metilasyon farkının da etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü *E. crypticus*'un NP etkisi olmayan bireylerinde gözlenen global DNA metilasyonu oranı %1,41 oranında görülürken, *G. mellonella* türünde bu oran %4,9'dur. Filogenetik gruplar içinde ve arasında DNA metilasyonunun evrimsel çeşitliliği, bu epigenetik işaretin işlevlerinin daha fazla değerlendirilmesi gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu açıdan bakıldığında büyük balmumu güvesi *G. mellonella* larvalarının epigenetik mekanizmaların araştırılması için önemli bir tür olduğu da vurgulanmaktadır. *G. mellonella*'nın yetiştirilmesinin hızlı ve kolay olması, epigenetik aktarımlar için çok nesilli çalışmalara uygun olması, NP uygulama ve verilisinin kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi ve deneysel uygulamaların memelilere göre daha zahmetsiz bir şekilde yapılabilmesi bu organizmanın önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Çok nesilli ve global DNA metilasyonu ile ilgili omurgasızlarda gerçekleştirilen diğer bir araştırmada DNA'da adenin bazlarında gerçekleşen metilasyon seviyeleri incelenmiştir. Wamucho ve diğerleri (2023), nematod iplik kurdu *Caenorhabditis elegans*'da adenozinlerde DNA metilasyonunu incelemek için EC₃₀ konsantrasyonlarında gümüş (Ag) NP uygulamalarını iki nesil boyunca gerçekleştirmiş, ardından iki jenerasyona hiçbir uygulama yapmamışlardır. Ag NP'lere maruz kalan *C. elegans*'da global DNA metilasyon seviyelerinde önemsiz artışlar görülmüştür (Wamucho ve diğ., 2023). Araştırmacıların Ag NP'lerin bir nematod türünde ve adenozinde gerçekleşen metilasyon üzerinde etkili olmadığı sonucuna ulaşmaları, sitozin metilasyonundaki etkileri hakkında merak uyandırmaktadır. Literatürde bu

nematodların genomik DNA'sındaki metillenmiş sitozin oranının %0,0019-0,0033 arasında gerçekleştiği bildirilmiştir ve bu oran oldukça düşüktür (Hu ve diğ., 2015). Adeninlerdeki metilasyon oranının ise %0,01-0,4 arasında değişebildiği bildirilmiştir (Greer ve diğ., 2015). Ag'nin antik çağlardan bu yana tedavi amaçlı kullanılması bakımından ele alındığında Ag NP'lerin metilasyon üzerinde etkisiz olduğunu gösteren verileri destekleyebileceği düşünülmektedir. Öte yandan çalışmamızda çeşitli konsantrasyonlarda kullandığımız Al₂O₃ NP'lerin sitozinde gerçekleşen global DNA metilasyonu birinci nesilde en çok %23,1 ve ikinci nesilde NP uygulanmadığı halde bile %18,4 olması metilasyonun ve epigenetik aktarımın yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak bu noktada *G. mellonella* türünde adenoazin metilasyonunun varlığı ve ne oranda gerçekleştiği hakkında bilgi yetersizliği söz konusudur ve literatürde bu konunun aydınlatılması önemli olacaktır.

Metal oksit NP'lerin yanı sıra literatürde metal iyonlarının DNA metilasyonuna etkisi ile ilgili tek nesilde araştırılan bir çalışma bulunmuştur (Sussarellu ve diğ., 2018). Çalışmada deniz yumuşakçası *Crassostrea gigas* (Pasifik istiridyesi) üzerinde dört farklı bakır konsantrasyonu (0,1; 1; 10 ve 20 µg/L Cu²⁺) uygulanmıştır. DNA metilasyon proteinlerini kodlayan 15 genin ifadesi RT-qPCR kullanılarak üç gelişim aşamasında (3 hpf (döllenme sonrası) morula aşaması, 7 hpf gastrula aşaması, 24 hpf D-larva aşaması); metilsitozin ve hidroksimetilsitozindeki global DNA içeriği HPLC ile ölçülmüştür. 1 µg/L ve üzeri konsantrasyonlarda önemli genotoksik etkiler tespit edilmiştir. Bakırın bazı homeoboks ve DNA metilasyon genlerinin ekspresyonunda değişiklikler gösterdiği belirtilmiştir. Özetle metilasyonun gen ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur (Sussarellu ve diğ., 2018). Bununla birlikte Cu²⁺ iyonları da CuO ve Al₂O₃ NP'ler gibi global DNA metilasyon seviyelerini arttırdığı görülmektedir. Burada incelenen epigenetik mekanizmalarda önemli DNMT gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler, kromatografik olarak elde ettiğimiz bulgularla örtüşmektedir. Pasifik istiridyesi genomu, modelimiz *G. mellonella* gibi DNA metilasyonu gerçekleştirir ve hayvanlarda DNA metilasyonu için gerekli DNMT gibi genleri içerir. Ayrıca iyonik bakır da oksitlenmiş nanoparçacık formları gibi epigenetik mekanizmalar üzerinde etkili değişikliklere yol açabileceğini düşündürmektedir.

Metaller arasında yer alan ve ksenobiyotikler olarak tanımlanabilen kadmiyum (Cd)'un çok nesilli etkisini içeren bir diğer çalışma, çizgili yaprak kurdu *Spodoptera exigua*'da (Lepidoptera: Noctuidae) DNA stabilitesinde dalgalanmalar olduğunu ortaya koymuştur (Augustyniak ve diğ., 2020). Bunun için böcekler farklı konsantrasyonlarda (5, 11, 22 ve 44 µg) Cd içeren gıda verilerek DNA stabilite seviyesi, 36. nesle kadar tüm nesillerde izlenmiştir. İlk üç nesilde özellikle diyetle daha yüksek dozda Cd alan gruplarda DNA hasarı yüksek; dördüncü nesilde ise önemli bir azalma olduğu bildirilmiştir (Augustyniak ve diğ., 2020). DNA metilasyonunun genom stabilitesi ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle DNA hasarı oluşturabilen Cd gibi ağır metallerin epigenetik mekanizmalarda da etkili olabileceği düşünülmektedir. Buna karşın şaşırtıcı bir şekilde sonraki nesillerde DNA stabilitesinde dönüşümlü bir artış ve azalma tespit edilmiştir (Augustyniak ve diğ., 2020). Al₂O₃ NP'lerde etkisini ikinci nesilde de gözlediğimiz şekilde, Cd'un DNA stabilitesini sonraki nesillerde etkilediği sonucu; metal ve metal oksit NP'lerin epigenetik mekanizmaları etkileyebileceği ve nesiller arası aktarımın gerçekleşebileceğini göstermektedir.

Omurgasızlarda çok nesilli ve nesiller arası etkileşimleri inceleyen; metal ve metal NP'lerin etkilerinin ortaya çıkarıldığı diğer araştırmalar popülasyon, sağkalım, üreme, biyoakümülyasyon, ROS üretimi ve gelişimsel toksisiteye odaklanmıştır (Araujo ve diğ., 2019; Kim ve diğ., 2013; Wang ve Liu, 2023). Araujo ve diğerleri (2019), kronik olarak kurşun (Pb) ile kontamine olmuş habitatlardaki ılıman (*Daphnia magna*) ve tropikal (*Daphnia similis*) ortam türlerini altı nesil Pb uygulanmış ve son üç nesil de temiz ortamda incelemişlerdir. Yüksek doz Pb grubu jenerasyonlarda *D. magna*'da mortalite görülürken, *D. similis*'in hayatta kalan tek düzenek olduğu bildirilmiştir (Araujo ve diğ., 2019). Kim ve diğerleri (2013), çeşitli konsantrasyonlarda 10 nm altın (Au) NP'lerin 12 saat besin uygulaması ile iplik kurdu *C. elegans* üzerindeki nesil transferi ve çok nesilli etkisini ebeveyn nesilden dördüncü jenerasyona kadar gözlemlemişlerdir. Au NP'ler sadece ebeveynlere uygulanmış ve üreme oranı ikinci nesilde etkilenecek üçüncü ve dördüncü nesillerde iyileştiği ortaya koyulmuştur (Kim ve diğ., 2013). Bu araştırmalar Pb ve Au NP'lerin mortalite ve üreme oranlarında değişiklikler oluşturduğunu ortaya koymakla birlikte epigenetik mekanizmaların etkili olabileceği sorusunu akla getirmektedir. Aynı zamanda araştırmacılar nesiller arasında tamamen bir iyileşme gözlenmediği için epigenetik değişikliklerin ve sonraki jenerasyonlara aktarımın bir

göstergesi olabileceğini vurgulamışlardır. Diğer bir çalışmada, Ag NP'lerin (50 ve 500 µg/L) tatlı su model gastropodları *Lymnaea stagnalis*'de (büyük gölet salyangozu) iki nesil boyunca transjenerasyonel etkileri gözlemlenmiştir (Wang ve Liu, 2023). Yirmi bir günlük NP uygulamasının ardından ebeveynlerin tüm yumuşak dokularında yüksek Ag biyoakümüasyonu ve ROS üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Ebeveynlerin Ag NP'lere maruz kalması, sonraki nesil üzerinde biyolojik etkiler göstererek gelişimsel toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (Wang ve Liu, 2023). Epigenetik modifikasyonların dışında çok nesilli araştırmalardaki sağkalım, üreme, biyoakümüasyon, oksidatif stres ve gelişimsel toksisite gibi diğer parametreler de epigenetik aktarımın gerçekleşebileceği varsayımını ortaya çıkarmaktadır. Öte yandan belirtilen bu varsayım daha ileri moleküler tekniklere ve spesifik analizlere ihtiyaç duyulduğunu ortaya çıkarmaktadır.

Nanoparçacıkların omurgasızlarda çok jenerasyonlu ve epigenetik modifikasyonlara etkileri ile ilgili yeni bir araştırma karbon bazlı NP'ler arasında yer alan grafen oksit (GO) ile gerçekleştirilmiştir. Flasz ve diğerleri (2023), beş nesil boyunca düşük konsantrasyonlarda nanoparçacık uygulanan ev cırcır böceğinin (*Acheta domesticus*) yabani ve uzun ömürlü olmak üzere iki türü üzerindeki beş nesil etkileri ve ardından bir iyileşme neslinde global DNA metilasyonunu incelemişlerdir. Nesiller boyunca global DNA metilasyonundaki dalgalanmalar yabani tip böceklerde daha belirgin olarak gerçekleştiği ifade edilmiştir. İlginç bir şekilde altıncı nesilde, her iki türün de en düşük DNA metilasyon seviyesini sergilediği belirtilmiştir. Ayrıca global DNA metilasyon seviyesi nispeten düşük ve incelenen gruplarda en fazla ortalama %5 oranında olduğu belirtilmiştir (Flasz ve diğ., 2023). Tüm deney gruplarımızda Al₂O₃ NP'lerin uygulaması sonucu gerçekleşen global DNA metilasyonunun en çok %23,1 olduğunu tespit ettik. Bu oran ev cırcır böceğinde gözlenen metilasyon oranının yaklaşık beş katına karşılık gelmektedir. Araştırmacılar bu farklılıkların böcek türlerinin (yabani ve uzun ömürlü) farklı yaşam stratejilerine bağlı olabileceğini vurgulamışlardır (Flasz ve diğ., 2023). Bu doğrultuda tüm böceklerde epigenetik değişikliklerin seviyeleri canlıya, yaşadığı çevresel koşullara ve maruz kaldıkları dış etmenlere göre farklılıklar gösterebildiği sonucuna varabilmekteyiz.

Çalışmada kullanılan diğer nanoparçacıklar nanoplastikler arasında yer alan laboratuvarıda ürettiğimiz ortalama 275 nm boyutundaki nano PS'dir. Literatürde plastik/polimerik nanoparçacıklardan ziyade yığın malzemelerinin böceklerde DNA metilasyonu üzerinde etkilerine önem veren tek bir çalışma bulunmuştur (Guo ve diğ., 2019). Özellikle günümüzde bu malzemelerin epigenetik etkileri merak konusu olmuştur ve literatürde bu etkileri gösteren veriler yetersiz bulunmaktadır. Polimerik bir malzeme olan PÜ köpük ile tek besin olarak beslenen un kurdunun (*Tenebrio molitor*) farklı gelişim aşamalarında mitokondriyal (mt) DNA metilasyonundaki değişiklikler araştırılmıştır (Guo ve diğ., 2019). PÜ köpük ile 21 gün beslendiklerinde *T. molitor* mtDNA'sının CpG ve CpG olmayan bölgelerinde farklı 5-metilsitozin seviyeleri gözlenmiştir. Larva aşamasında 10 CpG ve 49 CpG olmayan bölge tespit edilmiştir ve mtDNA metilasyonunun normal larvalara göre %12,38 arttığı belirtilmiştir. Pupa aşamasında 4 CpG ve 31 CpG olmayan bölge belirlenirken mtDNA metilasyonunun %3,79 oranında arttığı gösterilmiştir. Yetişkinlerde ise 7 CpG ve 56 CpG olmayan bölge belirlenmiştir (Guo ve diğ., 2019). *G. mellonella* larvalarında çeşitli konsantrasyonlarda uyguladığımız PS NP'ler iki nesilde görülen genomik DNA'daki metilasyon seviyelerini doza bağlı bir şekilde değiştirdi. İlk nesil larvalarda 50 ppm PS NP grubunda metillenmiş sitozin bazında %2,3'lük, NP uygulanmayan yavru nesil larvalarda ise %2,1'lik artış gözlemlendi. PS NP uygulanan 100 ppm gruplarında ise ebeveynlerde DNA metilasyon konsantrasyonunda %3,1 artış görülürken ikinci nesilde %3,9 artış belirlendi. İki nesildeki bu artışlar birbirine çok benzer değerler gösterdi ve önemsizdi. Öte yandan 500 ppm PS NP'ler DNA metilasyonunu ilk nesilde %17,2, ikinci nesilde %11,9 arttırdı. Bu artışlar DNA metilasyonundaki ilk belirgin ve önemli artışlardı. 1000 ppm PS NP gruplarında ilk nesilde %14,8 ikinci nesilde ise %13,9 artış ile 500 ppm grubunda gözlenen etkiye yakındı. Ancak, 1000 ppm grubunda DNA metilasyonunun yavru nesle aktarımı tüm gruplara göre daha etkindi. Guo ve diğerleri (2019), larval dönemde PÜ etkisiyle %12,38 oranında metilasyon artışı gözlerken, çalışmamızda PS NP'lerin en etkili artışının 500 ppm dozunda ilk nesilde %17,2 oranında gerçekleştiğini bulduk. İki araştırmanın sonucunda da polimerik malzemeler ve nanoparçacıkların DNA'daki epigenetik modifikasyonları net bir şekilde arttırdığını göstermektedir. Türler arasındaki fark göz ardı edildiğinde, metilasyon seviyelerindeki artışlarda NP uygulamasının daha etkili olabileceğini ve polimerik malzemelerde

boyutsal olarak farklılıkların ayırıcı nokta olduğu düşünülebilir. Aynı zamanda un kurdu larvalarının PÜ köpüğünü ne kadar tükettiği de araştırmacılar tarafından ifade edilmemiştir. Daha detaylı bir kıyaslama ve literatüre katkı sağlama bakımından nanoparçacık formundaki PÜ'nün araştırılmasının son derece önemli olabileceği önerilebilir.

Polimerik nano PS'ler ile ilgili başka bir araştırma, DNA hasarı ve onarımı ile ilgili farklı genlerin transkripsiyonel yanıtını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır (Martin-Folgar ve diğ., 2024). Titrek sinek larvalarına (*Chironomus riparius*, Diptera) PS NP dozlarının (0,1, 0,5 ve 3,0 ppm) 24 saat uygulanması sonucunda, DNA iplikçik kopmalarındaki önemli artışlardan dolayı büyük bir genotoksik etki ortaya çıkarmıştır. Dahası bu nanomalzemelerin varlığında DNA onarımında yer alan genlerin ekspresyonu azalmıştır. Araştırmacılar bu azalmanın PS NP'lerin neden olduğu DNA hasarının onarımını engellemesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Martin-Folgar ve diğ., 2024). Global DNA metilasyonu gibi modifikasyonlar DNA hasarına neden olan etkenler arasında yer almaktadır. Bu nedenle titrek sinek larvalarında 30 nm nano PS'lerin oluşturduğu DNA hasarı ve ortalama 275 nm olacak şekilde ürettiğimiz nano PS'lerin global DNA metilasyonu seviyelerindeki artışların birbirine benzer etkiler ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Buna ek olarak Martin-Folgar ve diğerlerinin (2024), titrek sinek larvalarında 24 saatlik akut nano PS uygulaması ve büyük balmumu larvalarında ortalama 25 günlük kronik uygulamamız sonucu, kısa ve uzun süreli plastik NP'lerin DNA hasarı ve metilasyon oluşturabileceği düşüncesi anlam kazanmaktadır.

Nanoplastiklerin çok nesilli etkileri üzerine yapılan araştırmalar özellikle apoptoz, nekroz, üreme toksisitesi, nanoplastik biyoakümüülasyonu ve sağkalım üzerine odaklanmıştır (Tu ve diğ., 2023; Heinlaan ve diğ., 2023). *D. melanogaster* ile yapılan bir çalışmada, böcekler beş nesil boyunca farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 50 ve 100 mg/L) 100 nm PS nanoplastiklere maruz bırakılmıştır. Bulgular PS'nin bağırsakta ve yumurtalıklarda biriktiğini ve bunun da yumurta üretimi ve kuluçka oranında düşüşe yol açtığını ortaya koymuştur. Beşinci nesilde oositler konsantrasyona bağlı bir şekilde apoptoz ve nekroz ortaya koymuştur (Tu ve diğ., 2023). Öte yandan, Heinlaan ve diğerleri (2023) 0,1 ve 1 mg/L konsantrasyonlarında PS NP'lere 21 günlük ardışık maruziyetini üç nesil *D. magna* üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 1 mg/L

konsantrasyonlarda *D. magna* üzerinde NP'lerin boyut ve lipit içeriğini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca sonraki nesillerde biyoakümülyasyon sorunu, özellikle de sonraki nesillerden NP toksisitesini etkili bir şekilde elimine edip edemeyeceği sorusu ortaya çıkmaktadır (Heinlaan ve diğ., 2023). Atıfta bulunulan çalışmalar, birçok durumda risk faktörlerinin olumsuz etkilerinin konsantrasyona veya doza bağlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle çeşitli konsantrasyonlarda, akut veya kronik tüm uygulamalarda nanoplastiklerin toksisite oluşturabileceği söz konusudur.

Böceklerin bağışıklık sistemindeki en önemli hücrel tepki enkapsülyasyon ve en önemli hümmoral tepki ise melanizasyon oluşumudur (Richards ve Edwards, 2002; Kaya ve diğ., 2021). Kara ve diğ. (2021), *G. mellonella* larvalarına enjekte edilen 10, 50 ve 100 µg/mL Al₂O₃ NP'lerin toplam hemosit sayısını (THC) azalttığını bildirmişlerdir. Böceklerde metal oksit Al₂O₃ NP'lerin akut uygulamasının 2, 4 ve 8 saat sonra bile etkili olduğu görölmektedir (Kara ve diğ., 2021). Çalışmamızda *G. mellonella* son dönem larvalarına 100 ppm ve artan Al₂O₃ NP uygulaması ile 4. saatin sonunda Sephadex boncuklarına verilen güçlü enkapsülyasyon tepkileri azaldı. 24 saatin sonunda ise güçlü enkapsülyasyon yanıtı düşük dozlarda bile azalarak etkili oldu. Özetle *G. mellonella*'nın Al₂O₃ NP'lere uzun süre maruz kalması, zaman içinde hücrel bağışıklık için önemli olan enkapsülyasyon yanıtını azaltmaktadır. Al₂O₃ NP'lerin THC'yi azaltması (Kara ve diğ., 2021), elde ettiğimiz güçlü enkapsülyasyon tepkisinin azalması ile bağlantılı olabileceğini düşünmekteyiz. Metal oksit NP'ler arasında yer alan CuO NP'ler ile yapılan bir araştırmada ise yüksek konsantrasyonlarda NP uygulamasının *G. mellonella*'nın THC'sinin ve buna bağlı olarak hücrel bağışıklık yanıtlarının azaldığı gözlemlenmiştir. THC'nin özellikle 1000 µg/mL ve LC₁₀ CuO NP'lerde en düşük olduğu bildirilmiştir (Tunçsoy ve diğ., 2021). Dahası Vidya ve Chitra (2018), Al₂O₃ NP'lerin uzun süreli diyetle alımının (LC₅₀-60 gün, 40 mg/L) tatlı su balığı *Oreochromis mossambicus*'un kanındaki seviyeleri artırabileceğini ve insan sağlığı üzerinde önemli etkilere neden olabileceğini vurgulamıştır (Vidya ve Chitra, 2018). Al₂O₃ (Kara ve diğ., 2021) ve CuO (Tunçsoy ve diğ., 2021) NP'lerin etkisi ile *G. mellonella* larvalarında artan NP dozlarına paralel olarak toplam hemositlerin azalması hücrel bağışıklık tepkilerinin tümünde olumsuz sonuçlar yaratabildiği gösterilmiştir. Çalışmamız bir diğ. hücrel bağışıklık tepkisi olan enkapsülyasyonda güçlü yanıtların azaldığını gösterdi. Bu durum enkapsülyasyon tepkisinin *G. mellonella* larvalarında

bulunan granülosit, plazmatosit, önositoid, siferülosit ve prohemosit gibi hücrelerin sayısının azalmasından kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Metal oksit NP'lerin etkisiyle hemositlerde muhtemelen apoptoz veya nekrozun atması hem THC sayısını hem de enkapsülasyon tepkisini azalttığını düşündürmektedir. Enkapsülasyon yanıtı hümmoral bağışıklığın bir belirleyicisi olan melanizasyon yanıtını indükler (Ling ve Yu, 2005). Çalışmada kullanılan metalik Al_2O_3 NP'nin 4. saatin sonundaki melanizasyon yanıtları en yüksek dozda (1000 ppm) azaldı. 24 saat sonra ise yüksek dozlarda (500 ve 1000 ppm) önemli bir düşüş tespit edildi. Elde ettiğimiz melanizasyon yanıtı ile ilgili veriler enkapsülasyon yanıtı sonuçlarına göre daha az etkili olmuştur. Bunun nedeni hümmoral bağışıklık sisteminde etkili olan serin proteaz kaskadında gerçekleşen enzimatik aktivasyonların ve melanin üretim sürecinin gecikmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen bir çalışmada Mao ve diğerleri (2018), Ag NP'lerin meyve sineği *D. melanogaster*'in gelişimi üzerinde zararlı etkilere ve ölümlere neden olduğunu bildirmiştir. Ölümcül olmayan dozlarda test edildiğinde, Ag NP'lerin dokularda apoptoz, DNA hasarı ve otofajiye yol açabilen ROS birikimine neden olduğu gösterilmiştir (Mao ve diğ., 2018). Buna karşılık, Moya-Andérico ve diğerleri (2021) tarafından gerçekleştirilen diğer bir araştırma Ag, selenyum ve fonksiyonelleştirilmiş Au NP'lerin tüm konsantrasyonları ile akut muamelenin *G. mellonella*'nın hemosit sayısında artışa neden olduğunu bildirmiştir (Moya-Andérico ve diğ., 2021). *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte olmuş *G. mellonella* larvalarının Ag NP'ler ile profilaktik uygulamasını amaçlayan araştırma larvalarda hemosit agregasyonu ve PO kaskadının Ag NP'ler ile daha az reaksiyon gösterdiğini bildirmiştir (Thomaz ve diğ., 2020). Sonuçlar Ag NP'lerin enfeksiyona karşı güçlü antimikrobiyal ajanlar olduğunu vurgulamaktadır (Thomaz ve diğ., 2020). Dahası Ag'nin antik çağlardan beri tedavi edici özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Ag NP'lerin konsantrasyonları göz önünde bulundurularak daha ayrıntılı toksikolojik ve immünolojik olarak değerlendirmesinin bir gereklilik oluşturduğu düşünülmektedir. Üstelik bu tür metal ve metal oksit nanoparçacıkların canlı sistemlerde tedavi edici uygulamalarda kullanımı için öldürücü konsantrasyonların ve uygun konsantrasyon aralıklarının belirlenmesi canlıların sağlığı bakımından son derece önemli olacaktır.

Genellikle PS NP'lerin sucul organizmalar üzerindeki etkileri ile ilgili ekotoksikolojik çalışmalara daha fazla odaklanılmıştır. Aynı zamanda NP'lerin kısa süreli veya doğrudan maruz kalma senaryolarının toksisite açısından sağladığı bilgiler yetersiz kabul edilmektedir (Kelpsiene ve diğ., 2022). Mikro (5,0-5,9 µm) ve nano-PS'lere (50-100 nm) akut olarak (72 saat) maruz kalan *B. mori* larvalarında PS'nin potansiyel zararlı etkilerini ve patojen enfeksiyonu (*Serratia marcescens* Bm1) üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışma bildirilmiştir (Muhammad ve diğ., 2021). 10 µg/mL konsantrasyonda $2,22 \times 10^{10}$ /mL (nano PS'ler) ve $9,78 \times 10^4$ /mL (mikro PS'ler) şeklinde hazırlanan çözeltiler (10 µg/mL), parçalara ayrılmış taze dut yapraklarının her iki yüzüne püskürtülerek larvalara verilmiştir. Vücut kütlelerinde ve sağkalımda önemli bir değişiklik bildirilmemiştir. Ancak, bağışıklıkla ilgili genlerin ifadesinde ve antioksidan aracılı koruyucu yanıtta farklılıklar gözlenmiştir. İlginç bir şekilde mikro PS'ler daha güçlü bir bağışıklık tepkisine neden olurken, nano PS'lerin tepkisi daha inhibe edici olmuştur. Mikro-PS'lere maruz kalan larvalar patojen enfeksiyonundan daha iyi kurtulurken, nano PS'lere maruz kalan larvalarda daha yüksek mortalite belirlenmiştir (Muhammad ve diğ., 2021). Mevcut çalışmada uzun süreli maruziyetin ardından PS NP'lerin böceklerdeki immünolojik etkilerine odaklanılarak literatürdeki eksikliğe katkıda bulunmak hedeflendi. PS NP'lerin 50 ve 100 ppm gibi düşük dozlarında 4. saatin sonunda Sephadexs boncuklara karşı güçlü enkapsülasyon tepkileri arttı. Ancak, güçlü enkapsülasyon seviyelerindeki bu artış bağışıklık sisteminin henüz baskılanmadığını ve PS NP'lere karşı bir immün savunmanın gerçekleştiğini gösterdi. Buna karşılık PS NP'lerin 500 ve 1000 ppm konsantrasyonları güçlü enkapsülasyon yanıtını önemli ölçüde azalttı. 24 saat sonra güçlü enkapsülasyon yanıtı daha düşük konsantrasyonlarda bile önemli ölçüde azaldı. Bu durum vücuda giren yabancı maddelerin ilk saatlerde bağışıklık sistemini aktifleştirerek yok edilmeye çalışılmasını göstermektedir. Ancak, saatler ilerledikçe yabancı maddelere karşı hücresel bağışıklık savunmasının azaldığı şeklinde yorumlanabilir. Sonuç olarak PS NP'lere kronik olarak maruz kalan larvalarda güçlü enkapsülasyon tepkisinin zamana bağlı bir şekilde inhibe olduğunu söylemek mümkündür. Öte yandan nanoplastiklerin bakteriler, bitkiler ve hayvanlar üzerindeki zararlı etkileri mikroplastiklere kıyasla daha belirgindir. Daha küçük nanoyapıların doku ve organlara nüfuz etmesinin daha kolay gerçekleştiği bildirilmiştir (Mattsson ve diğ., 2015). Bu araştırmalar kapsamında PS NP'lerin

boyutlarıyla yakından ilişkili olarak ekolojik toksisite sergilediği ve organizmaların bağışıklık sisteminin savunmasız hale gelmesine neden olabileceği sonucuna varıldı.

Toksikolojik çalışmalarla uyumlu olarak elde ettiğimiz veriler nano PS'lerin *G. mellonella* larvalarının enkapsülasyon tepkilerinde rol oynayan hemositlerin işlevini bozarak immün savunmanın azalmasına yol açtığını göstermektedir. Parenti ve diğerleri (2020), 0,5 µm PS nanoplastiklerin ipekböceği *B. mori* larvaları üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Larvaların, PS nanoplastiklerin sulu süspansiyonu ile kaplanmış yapay bir diyetle (0,5 g diyet içeriğinde 0,25 mg'da 50 µL su ile hazırlanmıştır) *ad libitum* olarak beslendiği bildirilmiştir. Larvaların bağırsak lümeninde, orta bağırsak epitelinde, Malpighian tübüllerinde ve hemositlerinde nanoplastiklerin varlığı gözlenmiştir (Parenti ve diğ., 2020). Hemositlerde biriktiği görülen nanoplastiklerin hücrenin fonksiyon kaybına neden olabileceği, apoptozu tetikleyebileceği düşünülebilir. Dahası hücresel mitotik indeksi azaltarak hücrelerin bağışıklık yanıtını oluşturabilmesi için hemositlerin çoğalmalarını ve farklılaşmalarını engelleyebilir. Yani inaktif prohemositlerin aktivasyonunu baskılayarak granülosit ve plazmatosit gibi enkapsülasyonda etkili, önositoid gibi melanin kaskadında görevli hücrelerin oluşumunu engelleyebileceği düşünülmektedir. Bu doğrultuda Parenti ve diğerlerinin (2020) araştırma bulguları, *G. mellonella*'da nano PS'lerin etkisi ile enkapsülasyon tepkisinin azalması şeklinde elde ettiğimiz verilerle uyumludur. Enkapsülasyon ile birlikte çalışmamız *G. mellonella* larvalarında 4 ve 24 saat sonra 100 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda PS NP etkisi ile melanizasyon tepkilerinin azaldığını gösterdi. Bu azalmalar hücresel fonksiyonun bozulması ve melanizasyon için başlatılan enzimatik kaskadların aktivasyonu gibi parametrelerin etkilenebileceği ile ilişkili olabilir.

PS nano ve mikro-plastik malzemelerin vücutta birikmesinin membran geçirgenliğini azaltabileceği ve protonların itici gücünü bozarak hücre fonksiyonu kaybına, hücre ölümüne, hormonal bozukluklara, immünotoksisiteye, nörotoksisiteye, üremeye ve gelişimsel kusurlara neden olabileceği bildirilmiştir (Guimarães ve diğ., 2021; Liu ve diğ., 2021; Sanchez-Hernandez, 2021). Yusufçuk larvalarında (*Aphylla williamsoni*) yapılan bir çalışmada, PS NP birikimi NO seviyelerini, tiyobarbitürik asit reaktif türlerini, SOD aktivitesini ve difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme aktivitesini etkilemiştir. PS NP'lerin böceklerin suyuna 48 saat boyunca 34 µg/L oranında eklendiği

grupta yüksek oranda kirlilik gözlenmiştir. Kirleticinin oksidatif stresi indükleyebildiği ve hayvanların antioksidan aktivitesini uyarabildiği sonucuna varılmıştır (Guimarães ve diğ., 2021). Yusufçuk larvalarında PS NP'lerin etkisi sonucu oksidatif hasarın oluşması hücre fonksiyonu kaybının ve hücre ölümünün sonucunda gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda kronik olarak uyguladığımız nano PS'ler muhtemelen balmumu larvalarında hücresel fonksiyonları bozarak, hücresel (enkapsülasyon) ve humoral (melanizasyon) bağışıklık tepkilerinin azalmasına neden oldu.

Omurgasızlarda humoral bağışıklık temeldir ve istilacıları ortadan kaldırmak için melanizasyon yoluyla nodülleri ortadan kaldırmaktadır. PO aktivitesindeki değişiklikler humoral bağışıklık sisteminin değerlendirilmesine olanak sağlar (Marmaras ve Lampropoulou, 2009). Bu enzim melanizasyon yanıtının önemli bir bileşenidir. Metalik 1 ve 0,1 g/L konsantrasyonlarda Ag NP'lerin Lepidopteran *S. litura* üzerinde PO aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, enzim aktivitesinde doza bağlı bir azalma bildirilmiştir (Raja Namasivayam ve Bharani, 2021). Çalışmamızda Al₂O₃ ve PS NP'ler (50 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda) PO enzim aktivitesinin azalmasına neden oldu. Kullanılan bu NP'lerin *G. mellonella* son evre larvalarında PO enzim aktivitesi üzerindeki etkileri melanizasyon sonuçları ile uyumludur. Ancak Al₂O₃ NP'lerin güçlü melanizasyon tepkisi 500 ve 1000 ppm dozlarında azalırken, PS NP'lerin güçlü melanizasyon tepkisi 100 ppm ve artan dozlarda azaldı. Bu nedenle PO enzim aktivitesindeki azalma bağışıklık sisteminin zayıflamasıyla sonuçlanmaktadır.

Elde edilen verilerin aksine literatürde farklı mikro ve nanoparçacıkların PO aktivitesini azalttığını gösteren veriler de mevcuttur (Mayall ve diğ., 2021; Martin-Folgar ve diğ., 2024; Silva ve diğ., 2021). Mayall ve diğerleri (2021), Isopoda takımına ait *Porcellio scaber* böceklerinin iki hafta boyunca Au NP'ler, CeO₂ NP'ler ve Au iyonlarına diyetle maruz bırakıldığında (100 µg/g kuru ağırlıkta gıda) ve bu NP'ler ile LPS endotoksininin enjekte edildiğinde PO benzeri aktivitenin, besleme ve enjeksiyondan sonra her iki NP (CeO₂ ve Au) uygulamasında da önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (Mayall ve diğ., 2021). PO benzeri aktivitedeki artışın bir sonucu olarak, yara iyileşmesi için gerekli melanizasyon seviyelerinin de arttığını bildirmişlerdir (Mayall ve diğ., 2021). Titrek sinekler arasında yer alan *C. riparius* larvalarında farklı konsantrasyonlarda uygulanan PS NP'lerin (0,1; 0,5 ve 3 ppm) 24 saat sonra PPO gen ifadesinde bir artış

gözlemlenmiştir (Martin-Folgar ve diğ., 2024). *C. riparius* larvalarında gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise PE mikropartikülleri (MP'ler; 32–63 µm; konsantrasyonlar: 1,25; 5 ve 20 g/kg; maruziyet süresi: 48 saat) bazal PO ve toplam PO (PO ve PPO) etkisi incelenmiştir (Silva ve diğ., 2021). Bazal PO aktivitesinde 5 ve 20 g PE MP/kg'da sırasıyla %26 ve %29 oranında önemli bir artış, toplam PO aktivitesinde ise %48'lik bir artış gözlenmiştir. Bu durumun organizmalar tarafından PPO'nun kendiliğinden sentezinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Öte yandan parçacık boyutu göz önüne alındığında, bağışıklık yanıtının aktivasyonu muhtemelen bağırsak lümeninin epitel hücrelerindeki hasarla bağlantılı olabileceği de vurgulanmıştır (Silva ve diğ., 2021). Bu son çalışmaların aksine Al₂O₃ ve PS NP uygulamalarının *G. mellonella*'da PO aktivitesindeki düşüşe bağlı olarak melanizasyonu artıracak bağışıklık tepkisini engellediği düşünülmektedir.

Canlı organizmalar AMP'lerin üretimi ve AMP genlerinin ekspresyonuyla dışardan alınan toksik maddelere kolayca yanıt verebilmektedirler. *G. mellonella* farklı nanomalzemelerin etkilerini araştırmak ve biyoçeşitlilik üzerindeki risklerini değerlendirmek için ekotoksikolojik araştırmalarda uygun ve çok yönlü bir modeli oluşturmaktadır. Böceklerde hümorale bağışıklık yanıtını oluşturan AMP'lerin gen ekspresyonları ve nanomalzemelerin bu süreçlere etkileri ile ilgili çok az veri mevcuttur (Muhammad ve diğ., 2022). Literatürde ipekböceği *B. mori*'de metal oksitler arasında yer alan CuO ve ZnO NP'lerin AMP gen ifadelerine etkisini inceleyen çalışma bu konudaki tek araştırmadır. Muhammad ve diğerleri (2022), CuO ve ZnO NP'lerin diyetle uygulanması ile ipekböceği *B. mori*'nin bağırsak, yağ doku, ipek bezi ve malpighian tüpünde Cu ve Zn'nin önemli ölçüde biriktiğini (Zn, Cu'ya göre daha fazla) belirtmişlerdir. Larvaların vücut kütlelerinde, sağkalım oranında ve koza üretiminde azalmalar gözlenmiştir. Ayrıca attasin, sekropin A, lizozim AMP'lerin genlerinin ekspresyonlarında azalmalara, apoptozla ilişkili Dronc gen ifadesinde ve SOD, GST, CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artmaya neden olduğu ve alfa-amilaz besin metabolizmasının bozulduğu bulunmuştur (Muhammad ve diğ., 2022). Çalışmamızda ise birinci nesil larvalarda Al₂O₃ NP doz uygulaması sonucu 1000 ppm grubunda galiyomisin mRNA ekspresyonunda ve 50-100 ppm grubunda p38 MAP kinaz gen ekspresyonunda azalmalar görüldü. Böcek defansinleri arasında yer alan galiyomisin ekspresyonunun ksenobiyotikler arasında bulunan nanoparçacıklar etkisiyle

azalması şimdiye kadar literatürde görülmemiştir. Bu ilk veriler 1000 ppm gibi yüksek dozlardaki Al_2O_3 NP'lerin hümmoral bağışıklığını baskılayarak galiyomisin ekspresyonunu azalttığını göstermektedir. İpekböceklerinde belirlenen attasin, sekropin A, lizozim gibi AMP'lerin ekspresyonlarındaki azalmalar ve araştırmamızdaki galiyomisin ve p38 MAPK AMP ekspresyonlarındaki azalmalar ile tutarlıdır. Buna ek olarak Al_2O_3 NP uygulanmayan ikinci nesil larvalarda ise 500 ve 1000 ppm gruplarında transferrin geninde artışlar; p38 MAPK geninde 50 ve 100 ppm gruplarında ise azalmalar görüldü. p38 MAPK transkripsiyon seviyeleri iki nesilde de benzerlik gösterdi. Böylece Al_2O_3 nanoparçacıkların transkripsiyonel etkisinin nesiller arası devam edebileceği sonucuna vardık. Diğer taraftan yüksek Al_2O_3 dozlarının transferrin ekspresyonunu arttırması demir taşıma ve bağlama fonksiyonlarının bozulduğunun ve hümmoral bağışıklık yanıtı olarak bu proteinlerin ekspresyonunu arttırdığının bir göstergesi olabilir. Genel olarak bu araştırmalar *B. mori* ve *G. mellonella* üzerindeki istenmeyen olumsuz etkilerini ortaya koymuş ve nanomalzemelerin yoğun ve olası yanlış kullanımı nedeniyle tüm canlıları kaçınılmaz olarak etkileme potansiyelini vurgulamıştır. Bununla birlikte farklı nanoparçacık türlerinin böceklerde gen ifadesi değişikliklerine yol açan strese neden olduğu gösterilmiştir (Muhammad ve diğ., 2022). Bu nedenle NP'lerin canlı organizmalara potansiyel olarak geniş kapsamlı etkileri olabileceğini ve çevresel etkilerinin değerlendirilmesinin önemli olduğuna dikkat çekilmektedir. Aynı zamanda bu tür çalışmalar ile nanoparçacıkların güvenli kullanımının ve çevresel etkilerinin değerlendirilmesi gerekliliği vurgulanmıştır.

İpekböceklerinde ksenobiyotiklerin aracılık ettiği immün sistemin baskılanması durumuna antibiyotikler (Li ve diğ., 2020; Sarvari ve diğ., 2020), nanoplastikler (Muhammad ve diğ., 2021) ve Guadipyr gibi böcek öldürücülerin (Hou ve diğ., 2021) neden olduğu bildirilmiştir. Li ve diğ. (2020), kloramfenikol (CAM) ve vankomisin (VCM) antibiyotiklerin uzun süreli tedavisinin fizyolojik ve toksikolojik tepkilerini araştırmışlardır. Otoklavlanmış yapay diyetle CAM 0,1 mg/kg dozunda eklenirken, VCM 0,2 µm membran filtre kullanılarak aynı konsantrasyonda eklenmiştir. Antibiyotiklerin ipekböceğinin bağırsağında oksidatif hasara neden olduğu bulunmuştur. Antibiyotik içeren besinle beslenen larvalarda attasin 2 ve lizozim transkript seviyeleri artmıştır. Antibiyotiğe maruz kaldıktan sonra, sekropin A transkript seviyesinin ise azaldığı belirtilmiştir. Özetle AMP gen ifadelerinin antibiyotikler

tarafından bozulduğu bildirilmiştir (Li ve diğ., 2020). Antibiyotiklerin uygulandığı diğ er bir çalışmada *G. mellonella* larvalarının bağırsağındaki NF- B (IMD ve Toll yolağı) genlerinin transkript seviyeleri analiz edilmiştir (Sarvari ve diğ., 2020). RT-qPCR sonuçları sekropin D, gloverin, gallerimisin, transferrin ve galiyomisin dahil olmak üzere farklı AMP'lerin *G. mellonella* bağırsağında transkripsiyonun önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Ancak, en fazla gen ekspresyonunda azalmanın transferrin ve galiyomisinde gerçekleştiğı belirtilmiştir (Sarvari ve diğ., 2020). Al₂O₃ NP'ler galiyomisin ve PS NP'ler ise transferrin ekspresyon düzeylerini belirli konsantrasyonlarda azalttı. Ek olarak çalışmamız hücre farklılaşması, gelişim, proliferasyon, migrasyon, apoptoz ve otofajiye katıldığı bilinen p38 MAPK transkripsiyonları da Al₂O₃ ve PS NP'lerin etkisi ile azalttığını gösterdi. İkinci nesillerde de benzer etkiler gözlendi ve genetik aktarımın gerçekleştiğı verilerle desteklendi. Çevresel etkenlerin (antibiyotikler ve nanoparçacıklar) böcekler üzerindeki etkilerini belirlemeye yönelik önemli bilgiler sağılayan bu çalışma ve araştırmamız arasında incelenen faktörler ve yöntemler farklı olduğı için doğırudan benzerlikler bulmak zor olabilir. Ancak, böceklerin hümoral bağışıklık sisteminde önemli Toll, IMD ve JAK-STAT sinyal yolaklarının aktivasyonu sonucu transkripsiyonel olarak AMP genlerinin ekspresyon seviyeleri iki farklı böcek türünde de değışikliklere neden olmuştur.

B. mori'de diyetle PS MP ve NP'lerin akut maruziyeti (72 saat) ve patojen (*Serratia marcescens* Bm1) enfeksiyonu sonucu oluşan bağışıklık sistemindeki etkiler değıerlendirilmiştir (Muhammad ve diğ., 2021). Bağışıklıkla ilgili bağırsakta yer alan sekropin A, lizozim ve attasin AMP'leri  zerindeki MP ve NP'lerin etkisi RT-qPCR ile değıerlendirildiğinde hem PS MP hem de PS NP gruplarında sekropin A transkripsiyon seviyesinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Öte yandan attasin gen ifade seviyeleri değışmeden kalmıştır. Lizozim seviyeleri sadece PS MP'lere maruz kalan bireylerde yükselmiştir (Muhammad ve diğ., 2021). Ksenobiyotikler arasında bulunan insektisit guadipirinin (C₁₂H₁₇ClN₆O₂) de ipekböcekleri (*B. mori*) için yüksek akut ve kronik toksisite sergilediğı bildirilmektedir (Hou ve diğ., 2021). Düşük doz 5,25 ve 10,5 mg/L guadipirin dut yapraklarına uygulayarak bu yapraklarla 96 saat beslenen ipekb ceklerinin bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri incelenmiştir. RT-qPCR ile sekropin A, sekropin B1, sekropin D, sekropin E, defensin1, morisin, lebosin, gloverin 2

ve gloverin 3 gibi AMP'lerin ekspresyon düzeyinin guadipire maruz kaldıktan sonra önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Hou ve diğ., 2021). Modelimiz *G. mellonella*'da PS NP'lerin uygulandığı birinci nesil larvalarda 50 ppm grubunda transferrin geninde ekspresyon seviyelerinin azaldığı; 500 ppm grubunda galiyomisin ekspresyonunun arttığı; p38 MAPK geninde ise 100, 500 ve 1000 ppm PS NP doz uygulaması ile mRNA ekspresyonunun azaldığı görüldü. İkinci nesil larvalarda ise 1000 ppm grubunda transferrin gen ekspresyon azalması; 500 ppm grubunda galiyomisin gen ekspresyon artışı; p38 MAP kinaz geninde ise 100 ve 500 ppm gruplarında gerçekleşen gen ekspresyon azalması belirlendi. İki nesilde de birbirine çok benzer sonuçlar görüldü ve gen ekspresyonlarında PS NP etkisi sonucu gerçekleşen değişiklikler nesiller arası aktarımı gösterdi. PS nanoplastiğinin *G. mellonella* bağışıklık sistemini etkilediği, genetik ve epigenetik düzeyde değişikliklere neden olduğu gösterildi. *B. mori*'deki PS NP'lerin etkisi sonucu sekropin A, PS MP'lerin etkisi sonucu ise lizozim transkripsiyon seviyesinin (Muhammad ve diğ., 2021) ve *G. mellonella*'daki galiyomisin transkripsiyonunun artışı, bu proteinlerin transkripsiyonunu başlatan sinyal yollarının aktif olduğunu ve bağışıklık sisteminin aktive olduğunu ifade etmektedir. Aksine PS NP etkisi ile *G. mellonella*'daki transferrin ile p38 MAPK genlerinde ve insektisit guadipir etkisi ile sekropin, defensin, morisin, lebosin, gloverin genlerinde ekspresyon seviyelerinin azalması (Hou ve diğ., 2021) sinyal yollarının aktivasyonunun azaldığını ve hümmoral bağışıklık tepkilerinin azaldığını göstermektedir. Toll, IMD ve JAK-STAT yolları böcek AMP ifadesini ve bağışıklık sistemini düzenleyen önemli yollarlardır. Bu nedenle her üç yol da guadipirden (Hou ve diğ., 2021) ve nano PS'lerden etkilenmiştir. Boyut olarak PS'lerin etkisi karşılaştırıldığında PS MP uygulanan bireylerde daha güçlü bir bağışıklık tepkisi indüksiyonu gözlenirken, PS NP'ler ipekböceğinde nispeten daha zayıf ve hatta engelleyici bağışıklık tepkisi göstermiştir (Muhammad ve diğ., 2021). Aynı zamanda doğal patojen *S. marcescens* Bm1 enfeksiyonu sonucu PS MP uygulanan bireyler enfeksiyondan daha iyi bir şekilde kurtulurken, PS NP uygulanan bireylerde önemli ölçüde daha yüksek mortalite oranı sergilediği de gösterilmiştir. PS MP/NP'lerin boyutlarıyla yakından ilişkili olan ekolojik toksisiteye sahip olduğu ve organizmaları savunmasız hale getirebileceği bildirilmiştir (Muhammad ve diğ., 2021). Nanoplastiklerin transkripsiyonel etkilerinden elde ettiğimiz veriler iki jenerasyonda da bu etkilerin devam ettiğini gösterdi. PS NP'ler hem

akut (Muhammad ve diğ., 2021) hem de kronik maruziyet sonucu bağışıklık sistemiyle ilgili gen ekspresyonlarını etkilemiştir. *B. mori* ve *G. mellonella*'da PS nanoparçacıklarının bağışıklık sistemi üzerinde etkili olduğu, boyut, organizma türü ve gen ekspresyon profili gibi faktörlerin bu etkileri modüle ettiği açıkça görülmektedir. Aynı zamanda çalışmamızda yer alan PS NP'lerin nesiller arası etkileri, bu tür nanoparçacıkların uzun vadeli genetik ve epigenetik etkilerinin devam edeceğini düşündürmektedir.

Böceklerde AMP gen ekspresyon seviyeleri stres faktörleri ve konak-parazitoid etkileşimleri sonucu parazitoidlerin zehir içerikleri tarafından da etkilenebilmektedir (Mowlds ve diğ., 2008; Özbek ve diğ., 2020). *G. mellonella* larvalarının iki dk boyunca avuç içinde çalkalanarak oluşturulan fiziksel stresin AMP genleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Mowlds ve diğ., 2008). Fiziksel strese maruz kalan larvalarda stres sonrası ilk saatlerde galiyomisin, IMPI, transferrin ve gallerimisin mRNA seviyelerinde yükselme görülmüştür. Fiziksel stres böcek bağışıklık tepkisini arttırmıştır (Mowlds ve diğ., 2008). Parazitoidler, diğer böcekleri konak olarak kullanan böceklerdir. Parazitoid-konak etkileşimleri bağışıklıkla ilgili gen ekspresyonlarını değiştirebilmektedir. *Pimpla turionellae*'nin ve konak *G. mellonella* pupalarının parazitlenme sonucu spesifik AMP'lerin gen ekspresyonlarının incelendiği çalışmada, konak bağışıklığı ile ilgili efektör genlerin baskılandığı bildirilmiştir (Özbek ve diğ., 2020). Parazitlenmiş *G. mellonella* pupalarında yumurta bırakıldıktan sonra belirli zaman noktalarında (4, 8, 24 ve 96 saat) 10 genin ekspresyon seviyelerinin güçlü bir şekilde azaldığı bulunmuştur. Öte yandan 24 saatte geçici olarak galiyomisin, sekropin A ve IMPI gen ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir. Bunlara ek olarak parazitlenme dönemi süresince gloverin, sekropin D, PPO1, PPO2 ve PO2 gen ekspresyonları azalmıştır. Parazitoidlerin zehir içeriğinin konak bağışıklık sistemini baskıladığı bildirilmiştir (Özbek ve diğ., 2020). Fiziksel stres (Mowlds ve diğ., 2008) ve parazitoidlerin zehir içeriğinin (Özbek ve diğ., 2020) uygulanmasından kısa süre sonra bazı gen bölgelerinde görülen gen ekspresyonlarını azalttığı bulguları ile belirli konsantrasyonlarda Al₂O₃ NP'lerin (ikinci nesilde) transferrin ve PS NP'lerin (hem birinci hem de ikinci nesilde) galiyomisin mRNA ekspresyonunu arttırdığı şeklindeki bulgularımız tutarlıdır. Aynı zamanda Özbek ve diğerlerinin (2020) parazitlenme süresince bu gen bölgelerindeki ekspresyon seviyelerinin azalması, kronik olarak uyguladığımız Al₂O₃ NP'lerin belirli

dozlarında (birinci nesilde) galiyomisin, PS NP'lerin (ikinci nesilde) transferrin ve her iki NP'nin tüm nesillerde p38 MAPK genlerinde ekspresyon seviyelerinin azalması ile tutarlıdır. Fiziksel ve kimyasal streslerin oluşması hüморal bağışıklık yanıtlarını önce arttırırken kronik maruz kalma gibi durumlar immün sistemi baskılayarak birbiriyle bağlantılı birçok bağışıklık sistem elemanlarını ve mekanizmalarını etkileyebilir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmada metalik Al_2O_3 ve plastik PS NP'lerin artan konsantrasyonlarının, global DNA metilasyonunu arttırdığı belirlendi. Dahası NP uygulanmayan ortamda yetiştirilmelerine rağmen sonraki jenerasyon larvalarda bile DNA metilasyonunu arttırdığı gözlemlendi. Ayrıca bu NP'lerin hücre fonksiyon kaybı nedeniyle enkapsülasyon ve melanizasyon gibi doğuştan gelen bağışıklık sistemini baskıladığını ortaya koydu. Al_2O_3 ve PS NP'lerin biyolojik bariyerleri aşma ve PO gibi çeşitli enzimatik kaskadları etkileme potansiyeline sahip olduğu gösterildi. Aynı zamanda bu metalik ve polimerik nanoparçacıkların AMP gen ekspresyonlarını etkileyerek bağışıklık sistemini transkripsiyonel olarak baskıladığı gösterildi. Öte yandan iki nesilde de nanoparçacık etkileri gözlemlendi ve nesiller arası transkripsiyonel değişikliklerin aktarımı görüldü. Metalik ve polimerik NP'lerin epigenetik ve bağışıklık tepkileri karşılaştırıldığında, küçük boyutlu metalik Al_2O_3 NP'lerin neden olduğu etkileşimin PS NP'lerin etkisine kıyasla daha hızlı ve etkili olduğu belirlendi.

NP'lerin boyutu, etki gücü, maruz kalma süresi ve konsantrasyonu gibi özelliklerinden dolayı nanoparçacıkların *in vivo* ve *in vitro* etki mekanizmaları farklı organizmalara ve hücre tiplerine göre değişebileceğinden, NP'lerin doğasını ve biyolojik etkileşimlerini ayrıntılı olarak aydınlatmak son derece önemlidir. Bu nedenle, *G. mellonella* larvaları nanopartikül toksisitesini incelemek için memeliler dışında alternatif bir nanotoksikolojik *in vivo* modeldir (Demirtürk ve diğ., 2023). Al_2O_3 ve PS NP'lerin etkilerini gösteren tüm bu veriler ileride epigenetik, immünolojik ve çok nesilli yapılacak araştırmalar için faydalı olabilecek niteliktedir ve memeliler üzerindeki olası etkilerin yorumlanmasına yardımcı olacaktır. Bunlara ek olarak epigenetik mekanizmalar ve bağışıklık sistemi ile ilgili araştırmaların, günümüzde ksenobiyotik kaynaklı etkilerin veya hastalıkların anlaşılması ve bunlara karşı önlem oluşturulması bakımından kritik öneme sahip olduğu vurgulandı.

KAYNAKLAR

- Akagi, T., Baba, M., Akashi, M. (2012). Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Polym. Nanomed.*, 31-64. DOI: 10.1007/12_2011_150
- Akbari, B., Tavandashti, M.P., Zandrahimi, M. (2011). Particle size characterization of nanoparticles—a practical approach. *Iran. J. Mater. Sci. Eng.*, 8(2), 48-56.
- Alaraby, M., Romero, S., Hernández, A., Marcos, R. (2019). Toxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in *Drosophila*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 60(3), 277-285. DOI: 10.1002/em.22262
- Ali Mohammadie Kojour, M., Han, Y.S., Jo, Y.H. (2020). An overview of insect innate immunity. *Entomol. Res.*, 50(6), 282-291. DOI: 10.1111/1748-5967.12437
- Alissa, E.M., Ferns, G.A. (2011). Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *J. Toxicol.*, 2011, 1-21. DOI: 10.1155/2011/870125
- Alshatwi, A.A., Vaiyapuri Subbarayan, P., Ramesh, E., Al-Hazzani, A.A., Alsaif, M.A., Alwarthan, A.A. (2012). Al₂O₃ nanoparticles induce mitochondria-mediated cell death and upregulate the expression of signaling genes in human mesenchymal stem cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 26(11), 469-476. DOI: 10.1002/jbt.21448
- Altincicek, B., Stötzl, S., Wygrecka, M., Preissner, K.T., Vilcinskas, A. (2008). Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. *J. Immunol.*, 181(4), 2705-2712. DOI: 10.4049/jimmunol.181.4.2705
- Altuntaş, H., Kılıç, A.Y., Uçkan, F., Ergin, E. (2012). Effects of gibberellic acid on hemocytes of *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae). *Environ. Entomol.*, 41(3), 688-696. DOI: 10.1603/EN11307
- Anand, A.S., Gahlot, U., Prasad, D.N., Amitabh, Kohli, E. (2019). Aluminum oxide nanoparticles mediated toxicity, loss of appendages in progeny of *Drosophila melanogaster* on chronic exposure. *Nanotoxicol.*, 13(7), 977-989. DOI: 10.1080/17435390.2019.1602680
- Anguissola, S., Garry, D., Salvati, A., O'Brien, P.J., Dawson, K.A. (2014). High content analysis provides mechanistic insights on the pathways of toxicity induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *PloS one*, 9(9), e108025. DOI: 10.1371/journal.pone.0108025
- Aperis, G., Fuchs, B.B., Anderson, C.A., Warner, J.E., Calderwood, S.B., Mylonakis, E. (2007). *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect.*, 9(6), 729-734. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.02.016

- Arafat, E.A., El-Sayed, D.S., Hussein, H.K., Flaven-Pouchon, J., Moussian, B., El-Samad, L.M., Wakil, A.E., Hassan, M.A. (2023). Entomotherapeutic Role of *Periplaneta americana* Extract in Alleviating Aluminum Oxide Nanoparticles-Induced Testicular Oxidative Impairment in Migratory Locusts (*Locusta migratoria*) as an Ecotoxicological Model. *Antioxidants*, 12(3), 653. DOI: 10.3390/antiox12030653
- Araujo, G.S., Abessa, D.M.S., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S. (2019). Multi-generational exposure to Pb in two monophyletic *Daphnia* species: Individual, functional and population related endpoints. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 173, 77-85. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.001
- Arul Prakash, F., Dushendra Babu, G.J., Lavanya, M., Shenbaga Vidhya, K., Devasena, T. (2011). Toxicity studies of aluminium oxide nanoparticles in cell lines. *Int. J. Nanotechnol. Appl.*, 5(2), 99-107.
- Ashida, M., Brey, P.T. (1995). Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92(23), 10698-10702. DOI: 10.1073/pnas.92.23.10698
- Ashwell, J.D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 6(7), 532-540. DOI: 10.1038/nri1865
- Augustyniak, M., Tarnawska, M., Dziewięcka, M., Kafel, A., Rost-Roszkowska, M., Babczyńska, A. (2020). DNA damage in *Spodoptera exigua* after multigenerational cadmium exposure-a trade-off between genome stability and adaptation. *Sci. Total Environ.*, 745, 141048. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141048
- Awet, T.T., Kohl, Y., Meier, F., Straskraba, S., Grün, A.L., Ruf, T., Jost, C., Drexel, R., Tunc, E., Emmerling, C. (2018). Effects of polystyrene nanoparticles on the microbiota and functional diversity of enzymes in soil. *Environ. Sci. Eur.*, 30(1), 1-10. DOI: 10.1186/s12302-018-0140-6
- Baedke, J. (2013). The epigenetic landscape in the course of time: Conrad Hal Waddington's methodological impact on the life sciences. *Stud. Hist. Philos. Sci. C Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.*, 44(4), 756-773. DOI: 10.1016/j.shpsc.2013.06.001
- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.*, 15(1), 675-705. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.675
- Barbato, V., Talevi, R., Gualtieri, R., Pallotta, M.M., Di Nardo, M., Costanzo, V., Catapano, G., Capriglione, T. (2020). Polystyrene nanoparticles may affect cell mitosis and compromise early embryo development in mammals. *Theriogenology*, 145, 18-23. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.007

- Barillas-Mury, C., Wizel, B., Han, Y.S. (2000). Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(6), 429-442. DOI: 10.1016/S0965-1748(00)00018-7
- Bartholomay, L.C., Fuchs, J.F., Cheng, L.L., Beck, E.T., Vizioli, J., Lowenberger, C., Christensen, B.M. (2004). Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 13(2), 125-132. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00467.x
- Bártová, E., Krejčí, J., Harničarová, A., Galiová, G., Kozubek, S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J. Histochem. Cytochem.*, 56(8), 711-721. DOI: 10.1369/jhc.2008.951251
- Barua, S., Mitragotri, S. (2014). Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: a review of current status and future prospects. *Nano today*, 9(2), 223-243. DOI: 10.1016/j.nantod.2014.04.008
- Beckage, N.E. (2008). *Insect Immunology* (1st ed.). San Diego: Academic Press.
- Benelli, G. (2018). Mode of action of nanoparticles against insects. *Environ. Sci. Poll. Res.*, 25(13), 12329-12341. DOI: 10.1007/s11356-018-1850-4
- Bergin, D., Murphy, L., Keenan, J., Clynes, M., Kavanagh, K. (2006). Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes infect.*, 8(8), 2105-2112. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.03.005
- Bewick, A.J., Vogel, K.J., Moore, A.J., Schmitz, R.J. (2017). Evolution of DNA methylation across insects. *Mol. Biol. Evol.*, 34(3), 654-665. DOI: 10.1093/molbev/msw264
- Bexiga, M.G., Varela, J.A., Wang, F., Fenaroli, F., Salvati, A., Lynch, I., Simpson, J.C., Dawson, K.A. (2011). Cationic nanoparticles induce caspase 3-, 7-and 9-mediated cytotoxicity in a human astrocytoma cell line. *Nanotoxicol.*, 5(4), 557-567. DOI: 10.3109/17435390.2010.539713
- Bicho, R.C., Roelofs, D., Marien, J., Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J. (2020). Epigenetic effects of (nano) materials in environmental species—Cu case study in *Enchytraeus crypticus*. *Environ. Int.*, 136, 105447. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105447
- Bonasio, R., Li, Q., Lian, J., Mutti, N.S., Jin, L., Zhao, H., Zhang, P., Wen, P., Xiang, H., Ding, Y., Jin, Z., Shen, S.S., Wang, Z., Wang, W., Wang, J., Berger, S.L., Liebig, J., Zhang, G., Reinberg, D. (2012). Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Curr. Biol.*, 22(19), 1755-1764. DOI: 10.1016/j.cub.2012.07.042

- Boros, I.M. (2012). Histone modification in *Drosophila*. *Brief. Funct. Genomics*, 11(4), 319-331. DOI: 10.1093/bfpg/els029
- Bronskill, J. (1961). A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *J. Lep. Soc.*, 15(2), 102-104.
- Brookman, J.L., Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (1989). Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect Biochem.*, 19(1), 47-57. DOI: 10.1016/0020-1790(89)90008-5
- Brooks, A.L., Wang, S., Jambeck, J.R. (2018). The Chinese import ban and its impact on global plastic waste trade. *Sci. Adv.*, 4(6), eaat0131. DOI: 10.1126/sciadv.aat0131
- Brown, S.E., Howard, A., Kasprzak, A.B., Gordon, K.H., East, P.D. (2008). The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(2), 201-212. DOI: 10.1016/j.ibmb.2007.10.009
- Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4(7), 597-603. DOI: 10.4161/viru.25906
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., Kagan, J.C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.*, 33, 257-290. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23(4-5), 329-344. DOI: 10.1016/S0145-305X(99)00015-4
- Cameron, S.J., Hosseinian, F., Willmore, W.G. (2018). A current overview of the biological and cellular effects of nanosilver. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(7), 2030. DOI: 10.3390/ijms19072030
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villaseñor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A. (2010). The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(1), 58-63. DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.12.010
- Candler, T., Kühnen, P., Prentice, A.M., Silver, M. (2019). Epigenetic regulation of POMC; implications for nutritional programming, obesity and metabolic disease. *Front. Neuroendocrinol.*, 54, 100773. DOI: 10.1016/j.yfrne.2019.100773

- Cassone, B.J., Grove, H.C., Elebute, O., Villanueva, S.M., LeMoine, C.M. (2020). Role of the intestinal microbiome in low-density polyethylene degradation by caterpillar larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Proc. R. Soc. B*, 287(1922), 20200112. DOI: 10.1098/rspb.2020.0112
- Castillo, J.C., Robertson, A.E., Strand, M.R. (2006). Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(12), 891-903. DOI: 10.1016/j.ibmb.2006.08.010
- Chen, J., Xie, C., Tian, L., Hong, L., Wu, X., Han, J. (2010). Participation of the p38 pathway in *Drosophila* host defense against pathogenic bacteria and fungi. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 107(48), 20774-20779. DOI: 10.1073/pnas.1009223107
- Chen, L., Yokel, R.A., Hennig, B., Toborek, M. (2008a). Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 3, 286-295. DOI: 10.1007/s11481-008-9131-5
- Chen, M., Zhu, Y.Y., Tao, J., Luo, Y.Q. (2008b). Methodological comparison of DNA extraction from *Holcocerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis. *For. Stud. China*, 10(3), 189-192. DOI: 10.1007/s11632-008-0035-5
- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J.E., Wang, Z., Li, E. (2003). Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.*, 23(16), 5594-5605. DOI: 10.1128/MCB.23.16.5594-5605.2003
- Cheng, T.F., Choudhuri, S., Muldoon-Jacobs, K. (2012). Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals: a review of the literature. *J. Appl. Toxicol.*, 32(9), 643-653. DOI: 10.1002/jat.2717
- Christensen, B.C., Marsit, C.J. (2011). Epigenomics in environmental health. *Front. Genet.*, 2, 84. DOI: 10.3389/fgene.2011.00084
- Chuang, J.C., Jones, P.A. (2007). Epigenetics and microRNAs. *Pediatr. Res.*, 61(7), 24-29. DOI: 10.1203/pdr.0b013e3180457684
- Clark, K.D., Pech, L.L., Strand, M.R. (1997). Isolation and Identification of a Plasmacyte-spreading Peptide from the Hemolymph of the Lepidopteran Insect *Pseudaletia includens*. *J. Biol. Chem.*, 272(37), 23440-23447. DOI: 10.1074/jbc.272.37.23440
- Coleman, J.G., Johnson, D.R., Stanley, J.K., Bednar, A.J., Weiss Jr, C.A., Boyd, R.E., Steevens, J.A. (2010). Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29(7), 1575-1580. DOI: 10.1002/etc.196

- Cook, S.M., McArthur, J.D. (2013). Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*, 4(5), 350-353. DOI: 10.4161/viru.25240
- Cunliffe, V.T. (2015). Experience-sensitive epigenetic mechanisms, developmental plasticity, and the biological embedding of chronic disease risk. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Syst. Biol. Med.*, 7(2), 53-71. DOI: 10.1002/wsbm.1291
- Cytryńska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P., Jakubowicz, T. (2007). Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, 28(3), 533-546. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.11.010
- Dammann, R.H., Richter, A.M., Jiménez, A.P., Woods, M., Küster, M., Witharana, C. (2017). Impact of natural compounds on DNA methylation levels of the tumor suppressor gene RASSF1A in cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(10), 2160. DOI: 10.3390/ijms18102160
- Das, S., Yadav, A., Debnath, N. (2019). Entomotoxic efficacy of aluminium oxide, titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.): A comparative analysis. *J. Stored Prod. Res.*, 83, 92-96. DOI: 10.1016/j.jspr.2019.06.003
- Davie, J.R. (2004). Histone modifications. *New Compr. Biochem.*, 39, 205-240. DOI: 10.1016/S0167-7306(03)39009-X
- Debnath, N., Das, S., Seth, D., Chandra, R., Bhattacharya, S.C., Goswami, A. (2011). Entomotoxic effect of silica nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Pest Sci.*, 84, 99-105. DOI: 10.1007/s10340-010-0332-3
- Delcuve, G.P., Rastegar, M., Davie, J.R. (2009). Epigenetic control. *J. Cell. Physiol.*, 219(2), 243-250. DOI: 10.1002/jcp.21678
- Delves, P.J., Roitt, I.M. (2000). The immune system. *N. Engl. J. Med.*, 343(1), 37-49.
- Demirtürk, Z., Uçkan, F., Mert, S. (2023). Interactions of alumina and polystyrene nanoparticles with the innate immune system of *Galleria mellonella*. *Drug Chem. Toxicol.*, 1-13.
- Desbois, A.P., Coote, P.J. (2012). Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents. Laskin, A.I., Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Ed.), *Adv. Appl. Microbiol.* (1st ed.) (78, 25-53). San Diego: Elsevier Inc.
- Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M., De Mele, M.F.L. (2010). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J. Hazard. Mater.*, 177(1-3), 711-718. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.089

- Diao, J., Gall, K., Dunn, M.L. (2003). Surface-stress-induced phase transformation in metal nanowires. *Nat. Mater.*, 2(10), 656-660. DOI: 10.1038/nmat977
- Dimopoulos, G., Casavant, T.L., Chang, S., Scheetz, T., Roberts, C., Donohue, M., Schultz, J., Benes, V., Bork, P., Ansorge, W., Soares, M.B., Kafatos, F.C. (2000). *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 97(12), 6619-6624. DOI: 10.1073/pnas.97.12.6619
- do Nascimento, A.M., Cuvillier-Hot, V., Barchuk, A.R., Simões, Z.L.P., Hartfelder, K. (2004). Honey bee (*Apis mellifera*) transferrin-gene structure and the role of ecdysteroids in the developmental regulation of its expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(5), 415-424. DOI: 10.1016/j.ibmb.2003.12.003
- Dolez, P.I. (2015). Nanomaterials definitions, classifications, and applications. Dolez, P.I. (Ed.), *Nanoengineering* (1st ed.) (3-40). Amsterdam: Elsevier Inc.
- Dubovskiy, I.M., Kryukova, N.A., Glupov, V.V., Ratcliffe, N.A. (2016). Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebr. Surviv. J.*, 13(1), 229-246. DOI: 10.25431/1824-307X/isj.v13i1.229-246
- Duhan, J.S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., Duhan, S. (2017). Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnol. Rep.*, 15, 11-23. DOI: 10.1016/j.btre.2017.03.002
- Dukhin, S.S., Labib, M.E. (2013). Convective diffusion of nanoparticles from the epithelial barrier toward regional lymph nodes. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 199, 23-43. DOI: 10.1016/j.cis.2013.06.002
- Egorova, K.S., Ananikov, V.P. (2017). Toxicity of metal compounds: knowledge and myths. *Organometallics*, 36(21), 4071-4090. DOI: 10.1021/acs.organomet.7b00605
- Ellis, J.D., Graham, J.R., Mortensen, A. (2013). Standard methods for wax moth research. *J. Apic. Res.*, 52(1), 1-17. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.10
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 358(11), 1148-1159.
- Europe, P. (2020). Plastics—the facts 2020. *PlasticEurope*, 1, 1-64.
- Fall, C.H., Kumaran, K. (2019). Metabolic programming in early life in humans. *Philos. Trans. Royal Soc. B*, 374(1770), 20180123. DOI: 10.1098/rstb.2018.0123
- Fallon, J.P., Troy, N., Kavanagh, K. (2011). Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence*, 2(5), 413-421. DOI: 10.4161/viru.2.5.17811

- Felsenfeld, G. (2014). A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 6(1), a018200. DOI: 10.1101/cshperspect.a018200
- Field, L.M., Lyko, F., Mandrioli, M., Prantera, G. (2004). DNA methylation in insects. *Insect Mol. Biol.*, 13(2), 109-115. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00470.x
- Finney, D.J., 1971. *Probit analysis* (1st ed.) New York: Academic Press.
- Flasz, B., Ajay, A.K., Tarnawska, M., Babczyńska, A., Majchrzycki, Ł., Kędzierski, A., Napora-Rutkowski, Ł., Świerczek, E., Augustyniak, M. (2023). Multigenerational Effects of Graphene Oxide Nanoparticles on *Acheta domesticus* DNA Stability. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(16), 12826. DOI: 10.3390/ijms241612826
- Footitt, R.G., Adler, P.H. (2009). *Insect biodiversity: science and society* (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Foulks, J.M., Parnell, K.M., Nix, R.N., Chau, S., Swierczek, K., Saunders, M., Wright, K., Hendrickson, T.F., Ho, K.K., McCullar, M.V., Kanner, S.B. (2012). Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases. *J. Biomol. Screen.*, 17(1), 2-17. DOI: 10.1177/1087057111421212
- Franco, N.H. (2013). Animal experiments in biomedical research: a historical perspective. *Animals*, 3(1), 238-273. DOI: 10.3390/ani3010238
- Frías-Lasserre, D., Villagra, C.A. (2017). The importance of ncRNAs as epigenetic mechanisms in phenotypic variation and organic evolution. *Front. Microbiol.*, 8, 2483. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02483
- Frohlich, E. (2013). Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *Curr. Drug Metab.*, 14(9), 976-988.
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomed.*, 7, 5577-5591. DOI: 10.2147/IJN.S36111
- Fröhlich, E., Samberger, C., Kueznik, T., Absenger, M., Roblegg, E., Zimmer, A., Pieber, T.R. (2009). Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress. *J. Toxicol. Sci.*, 34(4), 363-375. DOI: 10.2131/jts.34.363
- Galloway, T.S. (2015). Micro-and nano-plastics and human health. Bergmann, M., Gutow, L., Klages M. (Ed.). *Mar. anthropogenic Litt.* (1st ed.) (343-366). Switzerland: Springer International Publishing.
- Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., Bohacek, J., Pelczar, P., Prados, J., Farinelli, L., Miska, E., Mansuy, I.M. (2014). Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.*, 17(5), 667-669. DOI: 10.1038/nn.3695

- Gibney, E.R., Nolan, C.M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4-1. DOI: 10.1038/hdy.2010.54
- Glastad, K.M., Hunt, B.G., Goodisman, M.A.D. (2019). Epigenetics in insects: genome regulation and the generation of phenotypic diversity. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 185-203. DOI: 10.1146/annurev-ento-011118-111914
- Glastad, K.M., Hunt, B.G., Goodisman, M.A.D. (2014). Evolutionary insights into DNA methylation in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 1, 25-30. DOI: 10.1016/j.cois.2014.04.001
- Glastad, K.M., Hunt, B.G., Yi, S.V., Goodisman, M.A.D. (2011). DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. *Insect Mol. Biol.*, 20(5), 553-565. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2011.01092.x
- Goll, M.G., Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 481-514. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721
- Gorbe, M., Bhat, R., Aznar, E., Sancenón, F., Marcos, M.D., Herraiz, F.J., Prohens, J., Venkataraman, A., Martínez-Máñez, R. (2016). Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using pepino (*Solanum muricatum*) leaf extract and their cytotoxicity on HeLa cells. *Materials*, 9(5), 325. DOI: 10.3390/ma9050325
- Greer, E.L., Blanco, M.A., Gu, L., Sendinc, E., Liu, J., Aristizábal-Corrales, D., Hsu, C.H., Aravind, L., He, C., Shi, Y. (2015). DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell*, 161(4), 868-878. DOI: 10.1016/j.cell.2015.04.005
- Grewal, S.I., Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.*, 8(1), 35-46. DOI: 10.1038/nrg2008
- Grova, N., Schroeder, H., Olivier, J.L., Turner, J.D. (2019). Epigenetic and neurological impairments associated with early life exposure to persistent organic pollutants. *Int. J. Genomics*, 2019. DOI: 10.1155/2019/2085496
- Grünwald, S., Stellzig, J., Adam, I.V., Weber, K., Binger, S., Boll, M., Knorr, E., Twyman, R.M., Vilcinskas, A., Wenzel, U. (2013). Longevity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* is enhanced by broccoli and depends on nrf-2, jnk-1 and foxo-1 homologous genes. *Genes Nutr.*, 8, 439-448. DOI: 10.1007/s12263-012-0330-6
- Guimarães, A.T.B., de Lima Rodrigues, A.S., Pereira, P.S., Silva, F.G., Malafaia, G. (2021). Toxicity of polystyrene nanoplastics in dragonfly larvae: an insight on how these pollutants can affect benthic macroinvertebrates. *Sci. Total Environ.*, 752, 141936. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141936
- Gulati, R., Kaushik, H.D. (2004). Enemies of honeybees and their management—a review. *Agric. Rev.*, 25(3), 189-200.

- Guo, B., Yin, J., Hao, W., Jiao, M. (2019). Polyurethane foam induces epigenetic modification of mitochondrial DNA during different metamorphic stages of *Tenebrio molitor*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 183, 109461. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109461
- Guo, D., Xie, G., Luo, J. (2013). Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *J. Phys. D Appl. Phys.*, 47(1), 013001. DOI: 10.1088/0022-3727/47/1/013001
- Hall, M., Scott, T., Sugumaran, M., Söderhäll, K., Law, J.H. (1995). Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92(17), 7764-7768. DOI: 10.1073/pnas.92.17.7764
- Han, J., Nam, K.P., Seo, S.J., Yun, C.Y. (2004). Molecular cloning and characterization of transferrin from wax moth, *Galleria mellonella*. *Entomol. Res.*, 34(2), 139-145. DOI: 10.1111/j.1748-5967.2004.tb00103.x
- Handy, R.D., Henry, T.B., Scown, T.M., Johnston, B.D., Tyler, C.R. (2008). Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. *Ecotoxicol.*, 17, 396-409. DOI: 10.1007/s10646-008-0205-1
- Harshiny, M., Iswarya, C.N., Matheswaran, M. (2015). Biogenic synthesis of iron nanoparticles using *Amaranthus dubius* leaf extract as a reducing agent. *Powder Technol.*, 286, 744-749. DOI: 10.1016/j.powtec.2015.09.021
- Hashempour, S., Ghanbarzadeh, S., Maibach, H.I., Ghorbani, M., Hamishehkar, H. (2019). Skin toxicity of topically applied nanoparticles. *Ther. Deliv.*, 10(6), 383-396. DOI: 10.4155/tde-2018-0060
- Hassanpour, P., Panahi, Y., Ebrahimi-Kalan, A., Akbarzadeh, A., Davaran, S., Nasibova, A.N., Khalilov, R., Kavetskiy, T. (2018). Biomedical applications of aluminium oxide nanoparticles. *Micro Nano Lett.*, 13(9), 1227-1231. DOI: 10.1049/mnl.2018.5070
- Heinlaan, M., Viljalo, K., Richter, J., Ingwersen, A., Vija, H., Mitrano, D.M. (2023). Multi-generation exposure to polystyrene nanoplastics showed no major adverse effects in *Daphnia magna*. *Environ. Poll.*, 323, 121213. DOI: 10.1016/j.envpol.2023.121213
- Hernandez, L.M., Yousefi, N., Tufenkji, N. (2017). Are there nanoplastics in your personal care products?. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 4(7), 280-285. DOI: 10.1021/acs.estlett.7b00187
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 46(6), 3060-3075. DOI: 10.1021/es2031505

- Hillyer, J.F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.*, 58, 102-118. DOI: 10.1016/j.dci.2015.12.006
- Hoffmann, J.A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426(6962), 33-38. DOI: 10.1038/nature02021
- Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*, 3(2), 121-126. DOI: 10.1038/ni0202-121
- Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R., Zamir, A. (1965). Structure of a ribonucleic acid. *Science*, 147(3664), 1462-1465. DOI: 10.1126/science.147.3664.1462
- Hong, M., Hwang, D., Cho, S. (2018). Hemocyte morphology and cellular immune response in termite (*Reticulitermes speratus*). *J. Insect Sci.*, 18(2), 46. DOI: 10.1093/jisesa/iey039
- Horie, M., Fujita, K. (2011). Toxicity of metal oxides nanoparticles. Fishbein, J.C. (Ed.), *Advances in molecular toxicology* (1st ed.) (5, 145-178). Oxford: Elsevier.
- Hossain, M.K., Khan, M.I., El-Denglawey, A. (2021). A review on biomedical applications, prospects, and challenges of rare earth oxides. *Appl. Mat. Today*, 24, 101104. DOI: 10.1016/j.apmt.2021.101104
- Hou, J., Yu, J., Qin, Z., Liu, X., Zhao, X., Hu, X., Yu, R., Wang, Q., Yang, J., Shi, Y., Chen, L. (2021). Guadipyr, a new insecticide, induces microbiota dysbiosis and immune disorders in the midgut of silkworms (*Bombyx mori*). *Environ. Poll.*, 286, 117531. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117531
- Hu, C.W., Chen, J.L., Hsu, Y.W., Yen, C.C., Chao, M.R. (2015). Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC–MS/MS: first evidence of DNA methylation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.*, 465(1), 39-47. DOI: 10.1042/BJ20140844
- Hu, L., Yu, Y., Huang, H., Fan, H., Hu, L., Yin, C., Li, K., Fulton, D.J.R., Chen, F. (2017). Epigenetic regulation of interleukin 6 by histone acetylation in macrophages and its role in paraquat-induced pulmonary fibrosis. *Front. Immunol.*, 7, 696. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00696
- Huang, G., Shi, L.Z., Chi, H. (2009). Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine*, 48(3), 161-169. DOI: 10.1016/j.cyto.2009.08.002
- Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., Wang, H., Wang, Y., Shao, W., He, N., Hong, J., Chen, C. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10), 105104. DOI 10.1088/0957-4484/18/10/105104

- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G. (1980). Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, 106(1), 7-16. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x
- Imler, J.L., Zheng, L. (2004). Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *Journal of Leucocyte Biology*, 75(1), 18-26. DOI: 10.1189/jlb.0403160
- Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J., Hetru, C., Meister, M. (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell. Microbiol.*, 7(3), 335-350. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2004.00462.x
- Italiani, P., Della Camera, G., Boraschi, D. (2020). Induction of innate immune memory by engineered nanoparticles in monocytes/macrophages: From hypothesis to reality. *Front. Immunol.*, 11, 566309. DOI: 10.3389/fimmu.2020.566309
- Iwama, R., Ashida, M. (1986). Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 16(3), 547-555. DOI: 10.1016/0020-1790(86)90032-6
- Jablonka, E., Lamb, M.J. (2002). The changing concept of epigenetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 981(1), 82-96. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04913.x
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., Jacobsen, S.E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 416(6880), 556-560. DOI: 10.1038/nature731
- Jalili, P., Huet, S., Lancelleur, R., Jarry, G., Hegarat, L.L., Nessler, F., Hogeveen, K., Fessard, V. (2020). Genotoxicity of aluminum and aluminum oxide nanomaterials in rats following oral exposure. *Nanomaterials*, 10(2), 305. DOI: 10.3390/nano10020305
- Jenuwein, T., Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074-1080. DOI: 10.1126/science.1063127
- Jia, D., Jurkowska, R.Z., Zhang, X., Jeltsch, A., Cheng, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for *de novo* DNA methylation. *Nature*, 449(7159), 248-251. DOI: 10.1038/nature06146
- Johnson, N., Sanders, P. (2012). High strength low alloy (Hsla) aluminum. *Int. J. Met.*, 6(1), 61. DOI: 10.1007/BF03355480
- Joss-Moore, L.A., Lane, R.H., Albertine, K.H. (2015). Epigenetic contributions to the developmental origins of adult lung disease. *Biochem. Cell Biol.*, 93(2), 119-127. DOI: 10.1139/bcb-2014-0093

- Kader, F., Ghai, M., Maharaj, L. (2018). The effects of DNA methylation on human psychology. *Behavioural Brain Res.*, 346, 47-65. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.12.004
- Kara, A., Özalp, P., Tunçsoy, B., 2021. Alüminyum oksit'in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarında Total Hemosit Sayıları Üzerine Etkileri. *Eurasian J. Bio. Chem. Sci.*, 3(1), 195-198.
- Kaul, N., Forman, H.J. (1996). Activation of NFκB by the respiratory burst of macrophages. *Free Radic. Biol. Med.*, 21(3), 401-405. DOI: 10.1016/0891-5849(96)00178-5
- Kavanagh, K., Fallon, J.P. (2010). *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biol. Rev.*, 24(1-2), 79-83. DOI: 10.1016/j.fbr.2010.04.001
- Kay, S., Skowronski, D., Hunt, B.G. (2018). Developmental DNA methyltransferase expression in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Insect Sci.*, 25(1), 57-65. DOI: 10.1111/1744-7917.12413
- Kaya, S. (2020). The effects of pyrethrum extract on *Galleria mellonella* hemolymph phenoloxidase enzyme. *J. Sci. Perspect.*, 4(4), 269-280. DOI: 10.26900/jsp.4.024
- Kaya, S., Uçkan, F., Er, A. (2021). Influence of indole-3-acetic acid on cellular immune responses of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) and *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) in a host-parasitoid system. *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 41, 169-179. DOI: 10.1007/s42690-020-00190-z
- Keehnen, N.L., Fors, L., Järver, P., Spetz, A. L., Nylin, S., Theopold, U., Wheat, C.W. (2019). Geographic variation in hemocyte diversity and phagocytic propensity shows a diffuse genomic signature in the green veined white butterfly. *bioRxiv*, 790782. DOI: 10.1101/790782
- Kelpsiene, E., Ekvall, M.T., Lundqvist, M., Torstensson, O., Hua, J., Cedervall, T. (2022). Review of ecotoxicological studies of widely used polystyrene nanoparticles. *Environ. Sci. Process Impacts*, 24(1), 8-16. DOI: 10.1039/D1EM00375E
- Kenmoku, H., Hori, A., Kuraishi, T., Kurata, S. (2017). A novel mode of induction of the humoral innate immune response in *Drosophila* larvae. *Dis. Model Mech.*, 10(3), 271-281. DOI: 10.1242/dmm.027102
- Keshavarz, M., Jo, Y.H., Park, K.B., Ko, H.J., Edosa, T.T., Lee, Y.S., Han, Y.S. (2019). Tm DorX2 positively regulates antimicrobial peptides in *Tenebrio molitor* gut, fat body, and hemocytes in response to bacterial and fungal infection. *Sci. Rep.*, 9(1), 16878. DOI: 10.1038/s41598-019-53497-4

- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.*, 12(7), 908-931. DOI: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- Khan, S., Hossain, M.K. (2022). Classification and properties of nanoparticles. Rangappa, S.M., Parameswaranpillai, J., Yashas Gowda, T.G., Siengchin, S., Seydibeyoglu, M.O. (Ed.), *Nanoparticle-based Polym. Compos.* (1st ed.) (15-54). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Kik, K., Bukowska, B., Sicińska, P. (2020). Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environ. Poll.*, 262, 114297. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114297
- Kim, I.S., Baek, M., Choi, S.J. (2010). Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 10(5), 3453-3458. DOI: 10.1166/jnn.2010.2340
- Kim, S.G., Jo, Y.H., Seong, J.H., Park, K.B., Noh, M.Y., Cho, J.H., Ko, H.J., Kim, C.E., Tindwa, H., Patnaik, B.B., Bang, I.S., Lee, Y.S., Han, Y.S. (2017). TmSR-C, scavenger receptor class C, plays a pivotal role in antifungal and antibacterial immunity in the coleopteran insect *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 89, 31-42. DOI: 10.1016/j.ibmb.2017.08.007
- Kim, S.W., Kwak, J.I., An, Y.J. (2013). Multigenerational study of gold nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*: transgenerational effect of maternal exposure. *Environ. Sci. Technol.*, 47(10), 5393-5399. DOI: 10.1021/es304511z
- Kim, Y.S., Chung, Y.H., Seo, D.S., Choi, H.S., Lim, C.H. (2018). Twenty-eight-day repeated inhalation toxicity study of aluminum oxide nanoparticles in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Res.*, 34, 343-354. DOI: 10.5487/TR.2018.34.3.343
- Kirik, T., Kızılbey, K. (2019). Rutin yüklü PLGA Nanopartiküller; Farklı Yöntemler Kullanılarak Sentezi ve Karakterizasyonu. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 922-932. DOI: 10.21597/jist.481180
- Kizisar, D., Subasi, N.T., Eroksuz S., Demir, A.S., Mert, O. (2016). Investigation of the stabilization of camptothecin anticancer drug via PSA-PEG polymeric particles. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi A-Uygulamalı Bilimler ve Mühendislik*, 17(1), 221-231. DOI: 10.18038/btda.87862
- Klemeš, J.J., Fan, Y.V., Jiang, P. (2021). Plastics: friends or foes? The circularity and plastic waste footprint. *Energy Sources, A Recovery, Util., Environ. Eff.*, 43(13), 1549-1565. DOI: 10.1080/15567036.2020.1801906
- Koelmans, A.A., Besseling, E., Shim, W.J. (2015). Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review. Bergmann, M., Gutow, L., Klages M. (Ed.). *Mar. anthropogenic Litt.* (1st ed.) (325-340). Switzerland: Springer International Publishing.

- Kokoza, V., Ahmed, A., Woon Shin, S., Okafor, N., Zou, Z., Raikhel, A.S. (2010). Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 107(18), 8111-8116. DOI: 10.1073/pnas.1003056107
- Kong, H.G., Kim, H.H., Chung, J.H., Jun, J., Lee, S., Kim, H.M., Jeon, S., Park, S.G., Bhak., J., Ryu, C.M. (2019). The *Galleria mellonella* hologenome supports microbiota-independent metabolism of long-chain hydrocarbon beeswax. *Cell Rep.*, 26(9), 2451-2464. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.02.018
- Koprinarova, M., Garry, D., Hristov, D.R., Dimova, I., Dawson K.A. (2018). Induction of epigenetic response to amino-modified polystyrene nanoparticles in human cells. *Comptes Rendus de l'Académie Bulg. des Sci.*, 71(10), 1342-1349. DOI: 10.7546/CRABS.2018.10.07
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.005
- Kwadha, C.A., Ong'amo, G.O., Ndegwa, P.N., Raina, S.K., Fombong, A.T. (2017). The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8(2), 61. DOI: 10.3390/insects8020061
- Kwon, H., Smith, R.C. (2019). Chemical depletion of phagocytic immune cells in *Anopheles gambiae* reveals dual roles of mosquito hemocytes in anti-*Plasmodium* immunity. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 116(28), 14119-14128. DOI: 10.1073/pnas.1900147116
- Kyriakides, T.R., McKillip, J.L., Spence, K.D. (1995). Biochemical characterization, developmental expression, and induction of the immune protein scolexin from *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29(3), 269-280. DOI: 10.1002/arch.940290305
- Laughton, A.M., O'Connor, C.O., Knell, R.J. (2017). Responses to a warming world: Integrating life history, immune investment, and pathogen resistance in a model insect species. *Ecol. Evol.*, 7(22), 9699-9710. DOI: 10.1002/ece3.3506
- Lavine, M.D., Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10), 1295-1309. DOI: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9
- Lee, Y.S., Yun, E.K., Jang, W.S., Kim, I., Lee, J.H., Park, S.Y., Ryu, K.S., Seo, S.J., Kim, C.H., Lee, I.H. (2004). Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Mol. Biol.*, 13(1), 65-72. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2004.00462.x
- Lemaitre, B., Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 697-743. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615

- LeMoine, C.M., Grove, H.C., Smith, C.M., Cassone, B.J. (2020). A Very Hungry Caterpillar: Polyethylene Metabolism and Lipid Homeostasis in Larvae of the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*). *Environ.l Sci. Technol.*, 54(22), 14706-14715. DOI: 10.1021/acs.est.0c04386
- Leyrer, R.L., Monroe, R.E. (1973). Isolation and identification of the scent of the moth, *Galleria mellonella*, and a revaluation of its sex pheromone. *J. Insect Physiol.*, 19(11), 2267-2271. DOI: 10.1016/0022-1910(73)90143-1
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.*, 3(9), 662-673. DOI: 10.1038/nrg887
- Li, G., Sun, J., Hou, W., Jiang, S., Huang, Y., Geng, J. (2016). Three-dimensional porous carbon composites containing high sulfur nanoparticle content for high-performance lithium–sulfur batteries. *Nat. Commun.*, 7(1), 10601. DOI: 10.1038/ncomms10601
- Li, G., Xia, X., Zhao, S., Shi, M., Liu, F., Zhu, Y. (2020). The physiological and toxicological effects of antibiotics on an interspecies insect model. *Chemosphere*, 248, 126019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126019
- Liang, G., Chan, M.F., Tomigahara, Y., Tsai, Y.C., Gonzales, F.A., Li, E., Laird, P.W., Jones, P.A. (2002). Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol. Cell. Biol.*, 22(2), 480-491. DOI: 10.1128/MCB.22.2.480-491.2002
- Lilley, D.M. (2011). Mechanisms of RNA catalysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 366(1580), 2910-2917. DOI: 10.1098/rstb.2011.0132
- Ling, E., Yu, X.Q. (2005). Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(12), 1356-1366. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.08.007
- Liu, H., Tian, L., Qu, M., Wang, D. (2021). Acetylation regulation associated with the induction of protective response to polystyrene nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *J. Hazard. Mater.*, 411, 125035. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.125035
- Lockman, P.R., Koziara, J.M., Mumper, R.J., Allen, D.D. (2004). Nanoparticle surface charges alter blood–brain barrier integrity and permeability. *J. Drug Target.*, 12(9-10), 635-641. DOI: 10.1080/10611860400015936
- Loos, C., Syrovets, T., Musyanovych, A., Mailänder, V., Landfester, K., Nienhaus, G.U., Simmet, T. (2014). Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio–nano interactions. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 5(1), 2403-2412. DOI: 10.3762/bjnano.5.250

- Lou, Y., Ekaterina, P., Yang, S.S., Lu, B., Liu, B., Ren, N., Corvini P.F.X., Xing, D. (2020). Biodegradation of polyethylene and polystyrene by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella* L.) and the effect of co-diet supplementation on the core gut microbiome. *Environ. Sci. Technol.*, 54(5), 2821-2831. DOI: 10.1021/acs.est.9b07044
- Lötsch, J., Schneider, G., Reker, D., Parnham, M.J., Schneider, P., Geisslinger, G., Doebling, A. (2013). Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators. *Trends Mol. Med.*, 19(12), 742-753. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.08.006
- Lu, A.H., Salabas, E.E., Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46(8), 1222-1244. DOI: 10.1002/anie.200602866
- Lu, L., Zheng, T., Wu, Q., Schneider, A.M., Zhao, D., Yu, L. (2015). Recent advances in bulk heterojunction polymer solar cells. *Chem. Rev.*, 115(23), 12666-12731. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00098
- Lucchini, R.G., Dorman, D.C., Elder, A., Veronesi, B. (2012). Neurological impacts from inhalation of pollutants and the nose-brain connection. *Neurotoxicology*, 33(4), 838-841. DOI: 10.1016/j.neuro.2011.12.001
- Luo, X., Morrin, A., Killard, A.J., Smyth, M.R. (2006). Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanal.: Int. J. Devot. Fundam. Pract. Aspects Electroanal.*, 18(4), 319-326. DOI: 10.1002/elan.200503415
- Lyko, F. (2001). DNA methylation learns to fly. *Trends Genet.*, 17(4), 169-172. DOI: 10.1016/S0168-9525(01)02234-X
- Lyko, F., Maleszka, R. (2011). Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. *Trends Genet.*, 27(4), 127-131. DOI: 10.1016/j.tig.2011.01.003
- Madl, A.K., Plummer, L.E., Carosino, C., Pinkerton, K.E. (2014). Nanoparticles, lung injury, and the role of oxidant stress. *Annu. Rev. Physiol.*, 76, 447-465. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183735
- Maguire, R., Duggan, O., Kavanagh, K. (2016). Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an *in vivo* model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. *Cell Biol. Toxicol.*, 32, 209-216. DOI: 10.1007/s10565-016-9329-x
- Maharramov, A.M., Hasanova, U.A., Suleymanova, I.A., Osmanova, G.E., Hajiyeva, N.E. (2019). The engineered nanoparticles in food chain: Potential toxicity and effects. *SN Appl. Sci.*, 1, 1-25. DOI: 10.1007/s42452-019-1412-5
- Mandrioli, M., Volpi, N. (2003). The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methyl-cytosine. *Genetica*, 119, 187-191. DOI: 10.1023/A:1026016021415

- Manmode, A.S., Sakarkar, D.M., Mahajan, N.M. (2009). Nanoparticles-tremendous therapeutic potential: a review. *Int. J. of PharmTech Res.*, 1(4), 1020-1027.
- Manzoor, S., Ashraf, M.W., Tayyaba, S., Hossain, M.K. (2021). Recent progress of fabrication, characterization, and applications of anodic aluminum oxide (AAO) membrane: A review. *arXiv*, 2112.08450. DOI: 10.48550/arXiv.2112.08450
- Mao, B.H., Chen, Z.Y., Wang, Y.J., Yan, S.J. (2018). Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. *Sci. Rep.*, 8(1), 2445. DOI: 10.1038/s41598-018-20728-z
- Marmaras, V.J., Lampropoulou, M. (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell. Signal.*, 21(2), 186-195. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.08.014
- Marques-Santos, L.F., Grassi, G., Bergami, E., Faleri, C., Balbi, T., Salis, A., Damonte, G., Canesi, L., Corsi, I. (2018). Cationic polystyrene nanoparticle and the sea urchin immune system: biocorona formation, cell toxicity, and multixenobiotic resistance phenotype. *Nanotoxicol.*, 12(8), 847-867. DOI: 10.1080/17435390.2018.1482378
- Martin-Folgar, R., Sabroso, C., Cañas-Portilla, A. I., Torres-Ruíz, M., González-Caballero, M.C., Dorado, H., Velasco, I., Morales, M. (2024). DNA damage and molecular level effects induced by polystyrene (PS) nanoplastics (NPs) after *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Chemosphere*, 346, 140552. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.140552
- Mattsson, K., Ekvall, M.T., Hansson, L.A., Linse, S., Malmendal, A., Cedervall, T. (2015). Altered behavior, physiology, and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.*, 49(1), 553-561. DOI: 10.1021/es5053655
- Maya, S., Prakash, T., Madhu, K.D., Goli, D. (2016). Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomed.Pharmacother.*, 83, 746-754. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.07.035
- Mayall, C., Dolar, A., Jemec Kokalj, A., Novak, S., Razinger, J., Barbero, F., Puentes, V., Drobne, D. (2021). Stressor-dependant changes in immune parameters in the terrestrial isopod crustacean, *Porcellio scaber*: a focus on nanomaterials. *Nanomaterials*, 11(4), 934. DOI: 10.3390/nano11040934
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819-826. DOI: 10.1038/nature06246
- Melo, M.N., Ferre, R., Castanho, M.A. (2009). Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7(3), 245-250. DOI: 10.1038/nrmicro2095

- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M., Roch, P. (2000). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.*, 275(17), 12954-12962. DOI: 10.1074/jbc.275.17.12954
- Mogensen, T.H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.*, 22(2), 240-273. DOI: 10.1128/cmr.00046-08
- Mohanraj, V.J., Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Trop. J. Pharm. Res.*, 5(1), 561-573. DOI: 10.4314/tjpr.v5i1.14634
- Moita, L.F., Wang-Sattler, R., Michel, K., Zimmermann, T., Blandin, S., Levashina, E.A., Kafatos, F.C. (2005). *In vivo* identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. *Immunity*, 23(1), 65-73. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.05.006
- Morandin, C., Brendel, V.P., Sundström, L., Helanterä, H., Mikheyev, A.S. (2019). Changes in gene DNA methylation and expression networks accompany caste specialization and age-related physiological changes in a social insect. *Mol. Ecol.*, 28(8), 1975-1993. DOI: 10.1111/mec.15062
- Morgan, T.H. (1911). An attempt to analyze the constitution of the chromosomes on the basis of sex-limited inheritance in *Drosophila*. *J. Exp. Zool.*, 11(4), 365-413.
- Mowlds, P., Barron, A., Kavanagh, K. (2008). Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Microbes Infect.*, 10(6), 628-634. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.02.011
- Moya-Andérico, L., Vukomanovic, M., del Mar Cendra, M., Segura-Feliu, M., Gil, V., Del Río, J.A., Torrents, E. (2021). Utility of *Galleria mellonella* larvae for evaluating nanoparticle toxicology. *Chemosphere*, 266, 129235. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129235
- Muhammad, A., He, J., Yu, T., Sun, C., Shi, D., Jiang, Y., Xianyu, Y., Shao, Y. (2022). Dietary exposure of copper and zinc oxides nanoparticles affect the fitness, enzyme activity, and microbial community of the model insect, silkworm *Bombyx mori*. *Sci. Total Environ.*, 813, 152608. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.152608
- Muhammad, A., Zhou, X., He, J., Zhang, N., Shen, X., Sun, C., Yan, B., Shao, Y. (2021). Toxic effects of acute exposure to polystyrene microplastics and nanoplastics on the model insect, silkworm *Bombyx mori*. *Environ. Pollut.*, 285, 117255. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117255
- Mukherjee, K., Dubovskiy, I., Grizanov, E., Lehmann, R., Vilcinskas, A. (2019). Epigenetic mechanisms mediate the experimental evolution of resistance against parasitic fungi in the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Sci. Rep.*, 9(1), 1626. DOI: 10.1038/s41598-018-36829-8

- Mukherjee, K., Fischer, R., Vilcinskas, A. (2012). Histone acetylation mediates epigenetic regulation of transcriptional reprogramming in insects during metamorphosis, wounding and infection. *Front. Zool.*, 9(1), 1-12. DOI: 10.1186/1742-9994-9-25
- Mukherjee, K., Twyman, R.M., Vilcinskas, A. (2015). Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 118(1-2), 69-78. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.009
- Murugan, K., Dinesh, D., Paulpandi, M., Subramaniam, J., Rakesh, R., Amuthavalli, P., Panneerselvam, C., Suresh, U., Vadivalagan, C., Alsalhi, M.S., Devanesan, S., Wei, H., Higuchi, A., Nicoletti, M., Canale, A., Benelli, G. (2017). Mangrove helps: *Sonneratia alba*-synthesized silver nanoparticles magnify guppy fish predation against *Aedes aegypti* young instars and down-regulate the expression of envelope (E) gene in dengue virus (serotype DEN-2). *J. Clust. Sci.*, 28(1), 437-461. DOI: 10.1007/s10876-016-1115-7
- Müller, M.M., Muir, T.W. (2015). Histones: at the crossroads of peptide and protein chemistry. *Chem. Rev.*, 115(6), 2296-2349. DOI: 10.1021/cr5003529
- Nakao, M. (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*, 278(1-2), 25-31. DOI: 10.1016/S0378-1119(01)00721-1
- Nappi, A.J., Christensen, B.M. (2005). Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect biochem. Mol. Biol.*, 35(5), 443-459. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.01.014
- Nappi, A.J., Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, 22(5), 469-480. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur. J. Cell Biol.*, 68(4), 450-456.
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y. (2000). Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric oxide*, 4(4), 423-430. DOI: 10.1006/niox.2000.0294
- Naser, M.Z., Chehab, A.I. (2020). Polymers in space exploration and commercialization. AlMaadeed, M.A.A., Ponnamm, D., Carignano, M.A. (Ed.), *Polymer Science and Innovative Applications* (1st ed.) (457-484). Cambridge: Elsevier Inc.

- Nasir, K., Bittencourt, M.S., Blaha, M.J., Blankstein, R., Agatson, A.S., Rivera, J.J., Miedema, M.D., Sibley, C.T., Shaw, L.J., Blumenthal, R.S., Budoff, M.J., Krumholz, H.M. (2015). Implications of coronary artery calcium testing among statin candidates according to American College of Cardiology/American Heart Association cholesterol management guidelines: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J. Am. Coll. Cardiol.*, 66(15), 1657-1668.
- Nathan, C.F., Hibbs Jr, J.B. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, 3(1), 65-70. DOI: 10.1016/0952-7915(91)90079-G
- Nikolova, E.N., Stanfield, R.L., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2018). CH $\cdots$ O hydrogen bonds mediate highly specific recognition of methylated CpG sites by the zinc finger protein Kaiso. *Biochem.*, 57(14), 2109-2120. DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00065
- Noordhoek, J.W., Koning, J.T., Mariën, J., Kamstra, J.H., Amorim, M.J., van Gestel, C.A., van Straalen, N.M., Roelofs, D. (2018). Exploring DNA methylation patterns in copper exposed *Folsomia candida* and *Enchytraeus crypticus*. *Pedobiologia*, 66, 52-57. DOI: 10.1016/j.pedobi.2017.10.001
- Nunes, C., Sucena, É., Koyama, T. (2021). Endocrine regulation of immunity in insects. *The FEBS J.*, 288(13), 3928-3947. DOI: 10.1111/febs.15581
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, 113(7), 823-839. DOI: 10.1289/ehp.7339
- Oesterling, E., Chopra, N., Gavalas, V., Arzuaga, X., Lim, E.J., Sultana, R., Butterfield, D.A., Bachas, L., Hennig, B. (2008). Alumina nanoparticles induce expression of endothelial cell adhesion molecules. *Toxicol. Lett.*, 178(3), 160-166. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.03.011
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81656-6
- Okwaro, L.A., Korb, J. (2023). Epigenetic regulation and division of labor in social insects. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 58, 101051. DOI: 10.1016/j.cois.2023.101051
- Ono, K., Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cell. Signal.*, 12(1), 1-13. DOI: 10.1016/S0898-6568(99)00071-6
- Özbek, R., Mukherjee, K., Uçkan, F., Vilcinskas, A. (2020). Reprograming of epigenetic mechanisms controlling host insect immunity and development in response to egg-laying by a parasitoid wasp. *Proc. Royal Soc. B*, 287(1928), 20200704. DOI: 10.1098/rspb.2020.0704

- Pakrashi, S., Dalai, S., Sabat, D., Singh, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. (2011). Cytotoxicity of Al₂O₃ nanoparticles at low exposure levels to a freshwater bacterial isolate. *Chem. Res. Toxicol.*, 24(11), 1899-1904. DOI: 10.1021/tx200244g
- Parenti, C.C., Binelli, A., Caccia, S., Della Torre, C., Magni, S., Pirovano, G., Casartelli, M. (2020). Ingestion and effects of polystyrene nanoparticles in the silkworm *Bombyx mori*. *Chemosphere*, 257, 127203. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127203
- Park, S., Jo, Y.H., Park, K.B., Ko, H.J., Kim, C.E., Bae, Y.M., Kim, B., Jun, S.A., Bang, I.S., Lee, Y.S., Kim, Y.J., Han, Y.S. (2019). TmToll-7 plays a crucial role in innate immune responses against Gram-negative bacteria by regulating 5 AMP genes in *Tenebrio molitor*. *Front. Immunol.*, 10, 310. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00310
- Paul, M.B., Stock, V., Cara-Carmona, J., Lisicki, E., Shopova, S., Fessard, V., Braeuning, A., Sieg, H., Böhmert, L. (2020). Micro-and nanoplastics—current state of knowledge with the focus on oral uptake and toxicity. *Nanoscale Adv.*, 2(10), 4350-4367. DOI: 10.1039/D0NA00539H
- Pearson, A., Lux, A., Krieger, M. (1995). Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92(9), 4056-4060. DOI: 10.1073/pnas.92.9.4056
- Peintinger, M.F., Kratz, M.J., Bredow, T. (2014). Quantum-chemical study of stable, meta-stable and high-pressure alumina polymorphs and aluminum hydroxides. *J. Mater. Chem. A*, 2(32), 13143-13158. DOI: 10.1039/C4TA02663B
- Peralta-Videa, J.R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hong, J., Gardea-Torresdey, J.L. (2011). Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010. *J. Hazard. Mater.*, 186(1), 1-15. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.11.020
- Pereira, T.C., De Barros, P.P., Fugisaki, L.R.D.O., Rossoni, R.D., Ribeiro, F.D.C., De Menezes, R.T., Junqueira, J.C., Scorzoni, L. (2018). Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *J. Fungi*, 4(4), 128. DOI: 10.3390/jof4040128
- Pluskota, A., Horzowski, E., Bossinger, O., von Mikecz, A. (2009). In *Caenorhabditis elegans* nanoparticle-bio-interactions become transparent: silica-nanoparticles induce reproductive senescence. *PloS one*, 4(8), e6622. DOI: 10.1371/journal.pone.0006622
- Poborilova, Z., Opatrilova, R., Babula, P. (2013). Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a BY-2 plant cell suspension culture model. *Environ. Exp. Botany*, 91, 1-11. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.03.002

- Poon, C., Patel, A.A. (2020). Organic and inorganic nanoparticle vaccines for prevention of infectious diseases. *Nano Express*, 1(1), 012001. DOI 10.1088/2632-959X/ab8075
- Provataris, P., Meusemann, K., Niehuis, O., Grath, S., Misof, B. (2018). Signatures of DNA methylation across insects suggest reduced DNA methylation levels in Holometabola. *Genome Biol. Evol.*, 10(4), 1185-1197. DOI: 10.1093/gbe/evy066
- Qiu, L., Zhang, B., Liu, L., Wang, X., Lei, C., Lin, Y., Zhao, J., Ma, W. (2017). The role of p38 MAPK, JNK, and ERK in antibacterial responses of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.*, 110(4), 1460-1464. DOI: 10.1093/jee/tox126
- Radomski, A., Jurasz, P., Alonso-Escolano, D., Drews, M., Morandi, M., Malinski, T., Radomski, M.W. (2005). Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br. J. Pharmacol.*, 146(6), 882-893. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706386
- Raja Namasivayam, S.K., Bharani, R.S. (2021). Silver nanoparticles loaded pyrrole based pesticidal metabolites (AgNps-PFM) nanoconjugate induced impact on the gut microbion and immune response against lepidopteron pest *Spodoptera litura* (Fab.). *IJBB*, 58(5), 478-485. DOI: 10.56042/ijbb.v58i5.27378
- Rajput, V.D., Minkina, T.M., Behal, A., Sushkova, S.N., Mandzhieva, S., Singh, R., Gorovtsov, A., Tsitsuashvili, V.S., Purvis, V.O., Ghazaryan, K.A., Movsesyan, H.S. (2018). Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil, plants, animals and soil organisms: A review. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.*, 9, 76-84. DOI: 10.1016/j.enmm.2017.12.006
- Ramsahoye, B.H. (2002). Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods*, 27(2), 156-161. DOI: 10.1016/S1046-2023(02)00069-5
- Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., Akash, M.S.H. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J. Cell. Biochem.*, 119(1), 157-184. DOI: 10.1002/jcb.26234
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.*, 377(1), 159-169. DOI: 10.1042/bj20031253
- Revel, M., Châtel, A., Mouneyrac, C. (2018). Micro (nano) plastics: a threat to human health?. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*, 1, 17-23. DOI: 10.1016/j.coesh.2017.10.003
- Rhee, I., Bachman, K.E., Park, B.H., Jair, K.W., Yen, R.W.C., Schuebel, K.E., Cui, H., Feinberg, A.P., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Baylin, S.B., Vogelstein, B. (2002). DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, 416(6880), 552-556. DOI: 10.1038/416552a

- Richards, E.H., Dani, M.P. (2008). Biochemical isolation of an insect haemocyte anti-aggregation protein from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and identification of its gene. *J. Insect Physiol.*, 54(6), 1041-1049. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.04.003
- Richards, E.H., Edwards, J.P. (2002). Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation *in vivo*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 49(2), 108-124. DOI: 10.1002/arch.10013
- Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.*, 59(8), 3485-3498. DOI: 10.1021/jf104517j
- Roberts, S.B., Gavary, M.R. (2012). Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates?. *Front. Physiol.*, 2, 116. DOI: 10.3389/fphys.2011.00116
- Rodrigues, V., Cheah, P.Y., Ray, K., Chia, W. (1995). Malvolio, the *Drosophila* homologue of mouse NRAMP-1 (Bcg), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behaviour. *The EMBO J.*, 14(13), 3007-3020. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07303.x
- Rossoni, R.D., Fuchs, B.B., De Barros, P.P., Velloso, M.D.S., Jorge, A.O.C., Junqueira, J.C., Mylonakis, E. (2017). *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *PLoS One*, 12(3), e0173332. DOI: 10.1371/journal.pone.0173332
- Roth, T.L. (2013). Epigenetic mechanisms in the development of behavior: advances, challenges, and future promises of a new field. *Dev. Psychopathol.*, 25(4pt2), 1279-1291. 3. DOI: 10.1017/S0954579413000618
- Sadiq, I.M., Chowdhury, B., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. (2009). Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* to alumina nanoparticles. *Nanomedicine: NBM*, 5(3), 282-286. DOI: 10.1016/j.nano.2009.01.002
- Sak, O., Uçkan, F., Ergin, E. (2006). Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Belg. J. Zool.*, 136, 53-58.
- Sanchez-Hernandez, J.C. (2021). A toxicological perspective of plastic biodegradation by insect larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 248, 109117. DOI: 10.1016/j.cbpc.2021.109117

- Sankar, R., Manikandan, P., Malarvizhi, V., Fathima, T., Shivashangari, K.S., Ravikumar, V. (2014). Green synthesis of colloidal copper oxide nanoparticles using *Carica papaya* and its application in photocatalytic dye degradation. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 121, 746-750. DOI: 10.1016/j.saa.2013.12.020
- Sarkar, S., Rao, S.R.V., Gupta, V.S., Hendre, R.R. (1992). 5-Methylcytosine content in *Gryllotalpa fossor* (Orthoptera). *Genome*, 35(1), 163-166. DOI: 10.1139/g92-026
- Sarker, M., Rashid, M.M., Rahman, M.S., Molla, M. (2012). Aromatic light hydrocarbon fuel generation from municipal polystyrene (PS) waste plastic by using low temperature fractional distillation process. *Int. J.*, 2(8), 1-10.
- Sarvari, M., Mikani, A., Mehrabadi, M. (2020). The innate immune gene Relish and Caudal jointly contribute to the gut immune homeostasis by regulating antimicrobial peptides in *Galleria mellonella*. *Develop. Comp. Immunol.*, 110, 103732. DOI: 10.1016/j.dci.2020.103732
- Schaefer, M., Lyko, F. (2010). Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*, 119(1), 35-40. DOI: 10.1007/s00412-009-0240-6
- Schuhmann, B., Seitz, V., Vilcinskas, A., Podsiadlowski, L. (2003). Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 53(3), 125-133. DOI: 10.1002/arch.10091
- Seed, K.D., Dennis, J.J. (2008). Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect. Immun.*, 76(3), 1267-1275. DOI: 10.1128/iai.01249-07
- Seitz, V., Clermont, A., Wedde, M., Hummel, M., Vilcinskas, A., Schlatterer, K., Podsiadlowski, L. (2003). Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach. *Develop. Comp. Immunol.*, 27(3), 207-215. DOI: 10.1016/S0145-305X(02)00097-6
- Shanmugam, M.K., Arfuso, F., Arumugam, S., Chinnathambi, A., Jinsong, B., Warriar, S., Wang, L.Z., Kumar, A.P., Ahn, K.S., Sethi, G., Lakshmanan, M. (2018). Role of novel histone modifications in cancer. *Oncotarget*, 9(13), 11414. DOI: 10.18632/oncotarget.23356
- Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., Kavanagh, K. (2018). Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences?. *Virulence*, 9(1), 1625-1639. DOI: 10.1080/21505594.2018.1526531
- Shi, H., Ruan, L., Yan, X., Yao, D., Xu, X. (2014). The role of *Litopenaeus vannamei* p38 in white spot syndrome virus infection. *Develop. Comp. Immunol.*, 44(1), 180-185. DOI: 10.1016/j.dci.2013.12.005

- Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., Flora, S.J. (2014). Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug Chem. Toxicol.*, 37(3), 336-347. DOI: 10.3109/01480545.2013.866134
- Silva, C.J., Beleza, S., Campos, D., Soares, A.M., Silva, A.L.P., Pestana, J.L., Gravato, C. (2021). Immune response triggered by the ingestion of polyethylene microplastics in the dipteran larvae *Chironomus riparius*. *J. Hazard. Mater.*, 414, 125401. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125401
- Silva, L.F., Milanes, C., Pinto, D., Ramirez, O., Lima, B.D. (2020). Multiple hazardous elements in nanoparticulate matter from a Caribbean industrialized atmosphere. *Chemosphere*, 239, 124776. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124776
- Six, A., Krajangwong, S., Crumlish, M., Zadoks, R.N., Walker, D. (2019). *Galleria mellonella* as an infection model for the multi-host pathogen *Streptococcus agalactiae* reflects hypervirulence of strains associated with human invasive disease. *Virulence*, 10(1), 600-609. DOI: 10.1080/21505594.2019.1631660
- Skinner, M.K., Guerrero-Bosagna, C., Haque, M.M. (2015). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of sperm epimutations promote genetic mutations. *Epigenetics*, 10(8), 762-771. DOI: 10.1080/15592294.2015.1062207
- Skinner, M.K., Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C. (2010). Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol. Metabol.*, 21(4), 214-222. DOI: 10.1016/j.tem.2009.12.007
- Slack, J.M. (2002). Conrad Hal Waddington: the last renaissance biologist?. *Nat. Rev. Genet.*, 3(11), 889-895. DOI: 10.1038/nrg933
- Smith, P.E., (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1), 76-85.
- Smith, T.L. (1965). External morphology of the larva, pupa, and adult of the wax moth, *Galleria mellonella* L. *J. Kansas Entomol. Soc.*, 287-310.
- Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., Fransz, P.F. (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *The EMBO J.*, 21(23), 6549-6559. DOI: 10.1093/emboj/cdf657
- Srikanth, K., Mahajan, A., Pereira, E., Duarte, A.C., Venkateswara Rao, J. (2015). Aluminium oxide nanoparticles induced morphological changes, cytotoxicity and oxidative stress in Chinook salmon (CHSE-214) cells. *J. Appl. Toxicol.*, 35(10), 1133-1140. DOI: 10.1002/jat.3142
- Srinivasan, D.G., Brisson, J.A. (2012). Aphids: a model for polyphenism and epigenetics. *Genet. Res. Int.*, 2012. DOI: 10.1155/2012/431531

- Stanley, J.K., Coleman, J.G., Weiss Jr, C.A., Steevens, J.A. (2010). Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29(2), 422-429. DOI: 10.1002/etc.52
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H., Boman, H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292(5820), 246-248. DOI: 10.1038/292246a0
- Strand, M.R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Sci.*, 15(1), 1-14. DOI: 10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x
- Strand, M.R., Hayakawa, Y., Clark, K.D. (2000). Plasmacyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *J. Insect Physiol.*, 46(5), 817-824. DOI: 10.1016/S0022-1910(99)00171-7
- Sturtevant, A. H. (1913). The linear arrangement of six sex? linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J. Exp. Zool.*, 14(1), 43-59.
- Suganuma, T., Workman, J.L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu. Rev. Biochem.*, 80, 473-499. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061809-175347
- Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., Nabiev, I. (2018). Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Res. Lett.*, 13, 1-21. DOI: 10.1186/s11671-018-2457-x
- Sun, S.C., Faye, I. (1995). Transcription of immune genes in the giant silkworm, *Hyalophora cecropia*, is augmented by H₂O₂ and diminished by thiol reagents. *Eur. J. Biochem.*, 231(1), 93-98. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.0093f.x
- Sussarellu, R., Lebreton, M., Rouxel, J., Akcha, F., Rivière, G. (2018). Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.*, 196, 70-78. DOI: 10.1016/j.aquatox.2018.01.001
- Suzuki, M.M., Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.*, 9(6), 465-476. DOI: 10.1038/nrg2341
- Swedlow, J.R., Hirano, T. (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol. Cell*, 11(3), 557-569.
- Szyf, M. (2011). The early life social environment and DNA methylation: DNA methylation mediating the long-term impact of social environments early in life. *Epigenetics*, 6(8), 971-978. DOI: 10.4161/epi.6.8.16793

- Takayama, S., Dhahbi, J., Roberts, A., Mao, G., Heo, S. J., Pachter, L., Martin, D.I.K., Boffelli, D. (2014). Genome methylation in *D. melanogaster* is found at specific short motifs and is independent of DNMT2 activity. *Genome Res.*, 24(5), 821-830. DOI: 10.1101/gr.162412.113
- Talbert, P.B., Henikoff, S. (2017). Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 18(2), 115-126. DOI: 10.1038/nrm.2016.148
- Tariq, M., Saze, H., Probst, A.V., Lichota, J., Habu, Y., Paszkowski, J. (2003). Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 100(15), 8823-8827. DOI: 10.1073/pnas.1432939100
- Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J.A., Imler, J.L. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 97(19), 10520-10525. DOI: 10.1073/pnas.180130797
- Temple, T.L., Bagnall, D.M. (2011). Optical properties of gold and aluminium nanoparticles for silicon solar cell applications. *J. Appl. Phys.*, 109(8). DOI: 10.1063/1.3574657
- Tessarz, P., Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15(11), 703-708. DOI: 10.1038/nrm3890
- Thomaz, L., Gustavo de Almeida, L., Silva, F.R., Cortez, M., Taborda, C.P., Spira, B. (2020). *In vivo* activity of silver nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Galleria mellonella*. *Front. Microbiol.*, 2798. DOI: 10.3389/fmicb.2020.582107
- Thompson, G.J., Crozier, Y.C., Crozier, R.H. (2003). Isolation and characterization of a termite transferrin gene up-regulated on infection. *Insect Mol. Biol.*, 12(1), 1-7. DOI: 10.1046/j.1365-2583.2003.00381.x
- Tripathi, S., Champagne, D., Tufenkji, N. (2012). Transport behavior of selected nanoparticles with different surface coatings in granular porous media coated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Environ. Sci. Technol.*, 46(13), 6942-6949. DOI: 10.1021/es202833k
- Tsai, C.J.Y., Loh, J.M.S., Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214-229. DOI: 10.1080/21505594.2015.1135289
- Tsakas, S., Marmaras, V.J. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. *Invert. Surviv. J.*, 7(2), 228-238.

- Tu, Q., Deng, J., Di, M., Lin, X., Chen, Z., Li, B., Tian, L., Zhang, Y. (2023). Reproductive toxicity of polystyrene nanoplastics in *Drosophila melanogaster* under multi-generational exposure. *Chemosphere*, 330, 138724. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.138724
- Tuncsoy, B., Mese, Y. (2021). Influence of titanium dioxide nanoparticles on bioaccumulation, antioxidant defense and immune system of *Galleria mellonella* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 28(28), 38007-38015. DOI: 10.1007/s11356-021-13409-4
- Tuncsoy, B., Tuncsoy, M. (2023). Particle Size Effect of Micro and Nano Aluminium Oxides on Antioxidant Defence System of Model Organism *Galleria mellonella*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 110(4), 75. DOI: 10.1007/s00128-023-03715-7
- Tunçsoy, B., Sugeçti, S., Büyükgüzel, E., Özalp, P., Büyükgüzel, K. (2021). Effects of copper oxide nanoparticles on immune and metabolic parameters of *Galleria mellonella* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 107(3), 412-420. DOI: 10.1007/s00128-021-03261-0
- Uçkan, F., Er, A., Ergin, E. (2010). Levels of encapsulation and melanization in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized and envenomated by *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *J. Appl. Entomol.*, 134(9-10), 718-726. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2009.01459.x
- Uçkan, F., Ergin, E. (2002). Effect of host diet on the immature developmental time, fecundity, sex ratio, adult longevity, and size of *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae). *Environ. Entomol.*, 31(1), 168-171. DOI: 10.1603/0046-225X-31.1.168
- Valdiglesias, V., Pásaro, E., Méndez, J., Laffon, B. (2010). *In vitro* evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Arch. Toxicol.*, 84, 337-351. DOI: 10.1007/s00204-009-0505-0
- Varó, I., Perini, A., Torreblanca, A., Garcia, Y., Bergami, E., Vannuccini, M.L., Corsi, I. (2019). Time-dependent effects of polystyrene nanoparticles in brine shrimp *Artemia franciscana* at physiological, biochemical and molecular levels. *Sci. Total Environ.*, 675, 570-580. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.157
- Vidya, P.V., Chitra, K.C. (2018). Aluminium oxide nanoparticles induced irreversible alterations in the antioxidant defense system of the fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852). *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci*, 5(2), 1162-1170.
- Vilcinskis, A. (2011). Anti-infective therapeutics from the Lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Curr. Pharm. Des.*, 17(13), 1240-1245. DOI: 10.2174/138161211795703799

- Villagra, C., Frías-Lasserre, D. (2020). Epigenetic molecular mechanisms in insects. *Neotrop. Entomol.*, 49(5), 615-642. DOI: 10.1007/s13744-020-00777-8
- Vilmos, P., Kurucz, E. (1998). Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.*, 62(2), 59-66. DOI: 10.1016/S0165-2478(98)00023-6
- Vogel, H., Altincicek, B., Glöckner, G., Vilcinskas, A. (2011). A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC genomics*, 12(1), 1-19. DOI: 10.1186/1471-2164-12-308
- Vorbrodt, A.W., Dobrogowska, D.H., Lossinsky, A.S. (1994). Ultracytochemical studies of the effects of aluminum on the blood-brain barrier of mice. *J. Histochem. Cytochem.*, 42(2), 203-212. DOI: 10.1177/42.2.828886
- Voyias, P.D., Patel, A., Arasaradnam, R.P. (2016). Epigenetic biomarkers of disease. Tollefsbol, T.O., (Ed.), *Medical Epigenetics* (1st ed.) (159-176). United States: Elsevier Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-803239-8.00010-7
- Waddington, C.H. (1959). Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature*, 183(4676), 1654-1655. DOI: 10.1038/1831654a0
- Waddington, C.H. (2012). The epigenotype. *Int. J. Epidemiol.*, 41(1), 10-13. DOI: 10.1093/ije/dyr184
- Wamucho, A., Unrine, J., May, J., Tsyusko, O. (2023). Global DNA Adenine Methylation in *Caenorhabditis elegans* after Multigenerational Exposure to Silver Nanoparticles and Silver Nitrate. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(7), 6168. DOI: 10.3390/ijms24076168
- Wang, F., Bexiga, M.G., Anguissola, S., Boya, P., Simpson, J.C., Salvati, A., Dawson, K.A. (2013). Time resolved study of cell death mechanisms induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Nanoscale*, 5(22), 10868-10876. DOI: 10.1039/C3NR03249C
- Wang, L., Kounatidis, I., Ligoxygakis, P. (2014). *Drosophila* as a model to study the role of blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 3, 113. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00113
- Wang, T., Liu, W. (2023). Chronic and transgenerational effects of silver nanoparticles in freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Chemosphere*, 313, 137386. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.137386
- Wang, Y., Jiang, H., Kanost, M.R. (1999). Biological activity of *Manduca sexta* paralytic and plasmatocyte spreading peptide and primary structure of its hemolymph precursor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(12), 1075-1086. DOI: 10.1016/S0965-1748(99)00086-7

- Waring, R.H., Harris, R.M., Mitchell, S.C. (2018). Plastic contamination of the food chain: A threat to human health?. *Maturitas*, 115, 64-68. DOI: 10.1016/j.maturitas.2018.06.010
- Waterland, R.A., Michels, K.B. (2007). Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu. Rev. Nutr.*, 27, 363-388. DOI: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093705
- West-Eberhard, M.J. (2005). Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 304(6), 610-618. DOI: 10.1002/jez.b.21071
- Williams, M.J. (2007). *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.*, 178(8), 4711-4716. DOI: 10.4049/jimmunol.178.8.4711
- Wojda, I. (2017). Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci.*, 24(3), 342-357. DOI: 10.1111/1744-7917.12325
- Wojda, I., Koperwas, K., Jakubowicz, T. (2014). Activation of MAP kinase pathways in *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis*. *Acta Biochim. Pol.*, 61(1). DOI: 10.18388/abp.2014_1942
- Yacobi, N.R., DeMaio, L., Xie, J., Hamm-Alvarez, S.F., Borok, Z., Kim, K.J., Crandall, E.D. (2008). Polystyrene nanoparticle trafficking across alveolar epithelium. *Nanomedicine: NBM*, 4(2), 139-145. DOI: 10.1016/j.nano.2008.02.002
- Yamada, L., Chong, S. (2017). Epigenetic studies in developmental origins of health and disease: pitfalls and key considerations for study design and interpretation. *J. Dev. Orig. Health Dis.*, 8(1), 30-43. DOI: 10.1017/S2040174416000507
- Yan, H., Simola, D.F., Bonasio, R., Liebig, J., Berger, S.L., Reinberg, D. (2014). Eusocial insects as emerging models for behavioural epigenetics. *Nat. Rev. Genet.*, 15(10), 677-688. DOI: 10.1038/nrg3787
- Yang, L., Watts, D.J. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.*, 158(2), 122-132. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.03.003
- Yang, W.S., Noh, J.H., Jeon, N.J., Kim, Y.C., Ryu, S., Seo, J., Seok, S.I. (2015). High-performance photovoltaic perovskite layers fabricated through intramolecular exchange. *Science*, 348(6240), 1234-1237. DOI: 10.1126/science.aaa9272
- Yoshiga, T., Hernandez, V.P., Fallon, A.M., Law, J.H. (1997). Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 94(23), 12337-12342. DOI: 10.1073/pnas.94.23.12337

- Yousef, M.I., Mutar, T.F., Kamel, M.A.E.N. (2019). Hepato-renal toxicity of oral sub-chronic exposure to aluminum oxide and/or zinc oxide nanoparticles in rats. *Toxicol. Rep.*, 6, 336-346. DOI: 10.1016/j.toxrep.2019.04.003
- Yu, S., Rui, Q., Cai, T., Wu, Q., Li, Y., Wang, D. (2011). Close association of intestinal autofluorescence with the formation of severe oxidative damage in intestine of nematodes chronically exposed to Al₂O₃-nanoparticle. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 32(2), 233-241. DOI: 10.1016/j.etap.2011.05.008
- Yucel, M.S., Kayis, T. (2019). Imidacloprid induced alterations in oxidative stress, biochemical, genotoxic, and immunotoxic biomarkers in non-mammalian model organism *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae). *J. Environ. Sci. Health B*, 54(1), 27-34. DOI: 10.1080/03601234.2018.1530545
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-395. DOI: 10.1038/415389a
- Zemach, A., McDaniel, I.E., Silva, P., Zilberman, D. (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, 328(5980), 916-919. DOI: 10.1126/science.1186366
- Zhang, H.W., Liu, Y., Sun, S.H. (2010). Synthesis and assembly of magnetic nanoparticles for information and energy storage applications. *Front. Phys. China*, 5, 347-356. DOI: 10.1007/s11467-010-0104-9
- Zhang, X.Q., Yin, L.H., Tang, M., Pu, Y.P. (2011). ZnO, TiO₂, SiO₂, and Al₂O₃ nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts. *Biomed. Environ. Sci.*, 24(6), 661-669. DOI: 10.3967/0895-3988.2011.06.011
- Zorlu, T., Nurullahoğlu, Z.U., Altuntaş, H. (2018). Influence of dietary titanium dioxide nanoparticles on the biology and antioxidant system of model insect, *Galleria mellonella* (L.)(Lepidoptera: Pyralidae). *J. Entomol. Res. Soc.*, 20(3), 89-103.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- Bingul, İ., **Yılmaz, Z.**, Aydın, A.F., Çoban, J., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M. (2017). Karnozinin antiglikasyon ve antioksidan potansiyelinin yaşlı sıçanlarda incelenmesi. *Türk Klinik Biyokimya Kongresi*, Girne, KKTC, 04-07 Mayıs 2017.
- Bingül, İ., **Yılmaz, Z.**, Aydın, A.F., Çoban, J., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M. (2017). Antiglycation and anti-oxidant efficiency of carnosine in the plasma and liver of aged rats. *Geriatr. Gerontol. Int.*, 17(12), 2610-2614. DOI: 10.1111/ggi.13126
- Çoğal, E., Ellibeş-Gökkaya, T., **Demirtürk, Z.**, Uçkan, F. (2021). Alüminyum oksit nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*'nın hemositleri üzerine etkileri. *International Marmara Sciences Congress (Imascon Autumn)*, Kocaeli, Türkiye, 10-11 December 2021.
- Demirtürk, Z.**, Uçkan, F. (2022). Oxidative Effect Of Aluminium Oxide Nanoparticles On *Galleria mellonella* Larval Haemolymph", *International Marmara Sciences Congress (Imascon Autumn 2022)*, Kocaeli, Türkiye, 09-10 December, 2022.
- Demirtürk, Z.**, Uçkan, F., Mert, S. (2023). Interactions of alumina and polystyrene nanoparticles with the innate immune system of *Galleria mellonella*. *Drug Chem. Toxicol.*, 1-13. DOI: 10.1080/01480545.2023.2217484
- Ellibeş-Gökkaya, T., Çoğal, E., **Demirtürk, Z.**, Uçkan, F. (2021). Polistiren nanopartiküllerinin *Galleria mellonella*'nın hemositlerine etkileri. *International Marmara Sciences Congress (Imascon Autumn)*, Kocaeli, Türkiye, 10-11 December 2021.
- Eskin, A., Yusufoglu, F., **Demirtürk, Z.**, Uçkan, F. (2022). The Effect Of The Venom Of The Endoparasitoid *Pimpla turionellae* On The Antioxidant System Of The Host *Galleria mellonella*" *International Marmara Sciences Congress (Imascon Autumn 2022)*, Kocaeli, Türkiye, 09-10 December 2022.
- Kalaz, E.B., **Yılmaz, Z.**, Aydın A.F., Çoban, J., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M. (2016). Doğal yaşlı sıçanlarda ve galaktoz ile oluşturulan yaşlanma modelinde glikasyon ve oksidasyon ürünleri üzerine karnozinin etkisinin incelenmesi. XV. *Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi*, Fethiye, Türkiye, 23-26 Nisan 2016.
- Keloğlan, R., **Demirtürk, Z.**, Uçkan, F. (2021). Regulative Influence of Propolis on Oxidative Stress and Hormonal Changes in Chronic Unpredictable Mild Stress-induced Depression Model of Rats. *The Pharm. Chem. J.*, 8(2), 29-37.
- Keloğlan, R., Uçkan, F., **Demirtürk, Z.** (2019). Effects of propolis on oxidative parameters in rats administered chronic unpredictable health stress. IV. *International Scientific and Vocational Studies Congress – Science and Health*, Ankara, Türkiye, 07-10 November 2019.

- Uçkan, F., **Demirtürk, Z.**, Tetik, H.M. (2021). Konak *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) hemolenf kimyasına indol-3-asetik asitin etkisi. *Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4(1), 38-42.
- Yılmaz, Z.**, Kalaz, E.B., Aydın, A.F., Olgaç, V., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M., Koçak-Toker, N. (2018). The effect of resveratrol on glycation and oxidation products in plasma and liver of chronic methylglyoxal-treated rats. *Pharmacol. Rep.*, 70(3), 584-590. DOI: 10.1016/j.pharep.2017.12.005
- Yılmaz, Z.**, Kalaz, E.B., Aydın, A.F., Soluk-Tekkeşin, M., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M., Koçak-Toker, N. (2017). The effect of carnosine on methylglyoxal-induced oxidative stress in rats. *Arch. Physiol. Biochem.*, 123(3), 192-198. DOI: 10.1080/13813455.2017.1296468



ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Kocaeli’de tamamladı. 2007 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde bir yıl hazırlık eğitimi ile birlikte 2012 yılında mezun oldu. 2013-2015 yılları arasında, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2016-2018 yılları arasında özel bir Gıda Kontrol Laboratuvarında Mikrobiyoloji Laboratuvar Sorumlusu ve GDO Laboratuvarı’nda Uzman Biyolog olarak çalıştı. 2018 yılından beri Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde YÖK 100/2000 programında Mikro ve Nano teknoloji Öncelikli Alanlar Projesinde bursiyer olarak doktorasını tamamladı.

