



## Bakır Oksit Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* Larvaları Üzerine İmmün ve Metabolik Etkileri

*Immune and Metabolic Effects of Copper Oxide Nanoparticles on Galleria mellonella L. Larvae*

Benay Sezer Tunçsoy\* 

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Adana, Türkiye

### Öz

Bu çalışmada bakır oksit nanopartiküllerinin (CuO NP) LD<sub>50</sub> konsantrasyonunun etkisinde *Galleria mellonella* larvalarının orta barsak ve yağ dokularındaki protein, glikojen ve lipit miktarları ile immün sistemde önemli bir parameter olan total hemosit sayısı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

CuO NP' nin *G. mellonella* orta barsak ve yağ dokusundaki protein miktarında istatistiki açıdan fark gözlenmezken, glikojen ve lipit miktarlarında azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir. Total hemosit sayısında ise, CuO NP' nin etkisinde azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, CuO NP' nin immün ve metabolik sistemler üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Bakır oksit nanopartikülleri, Glikojen, Lipit, Protein, Total hemosit sayısı

### Abstract

The aim of this study was to determine the effect of LD<sub>50</sub> concentration of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) on the amount of protein, glycogen and lipid in the midgut and fat body of *Galleria mellonella* larvae and total hemocyte count which is an important parameter in the immune system.

While CuO NPs were not statistically different protein content in midgut and fat body of *G. mellonella*, it was found that glycogen and lipid contents were decreased. As for, total hemocyte count decreased when CuO NPs were applied to the diet. In conclusion, it was shown that CuO NPs caused toxic effects on immune and metabolic systems of *G. mellonella*.

**Keywords:** Copper oxide nanoparticles, Glycogen, Lipid, Protein, Total hemocyte count

### 1. Giriş

Son yıllarda ağır metaller, madencilik, boya, plastik, cam sanayi, metal kaplama, tarım alanlarında pestisit ve yapay gübre olarak sıklıkla kullanılmakta, sonuç olarak çevre ve hedef olmayan canlılar üzerinde toksik etkilere neden oldukları bilinmektedir.

Nanomateriyaller, yüzey alanlarının geniş olması ve yüksek reaksiyon aktiviteleri ile son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Nanoteknolojinin hızlı gelişim göstermesi sonucu çeşitli boyut ve çaplardaki bu nanomateriyaller ticari ve endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Amelia vd., 2012, Tang vd., 2012). Metal bazlı nanomateriyaller ise, birçok endüstri alanları ile biyoteknoloji ve tıp

alanlarında görüntüleme sıklıkla kullanılmakta ve çevreyi kirletmektedir.

Metal oksit nanopartikülleri, çeşitli ticari ürünlerde diğer nanopartiküllere kıyasla en fazla kullanılan nanopartiküllerdir ve potansiyel toksisiteleri bakımından çevre ve insan sağlığı açısından büyük tehdit oluşturmaktadır (Aschberger vd., 2011). Biyolojik membranlardan rahatlıkla geçebilen nanopartiküller organ, doku ve hücrede moleküler düzeyde olumsuz etkilere neden olabilmektedirler (Schrand vd., 2010).

Yüksek düzeyde termal ve elektriksel iletkenliği olması nedeniyle metal oksit nanopartikülleri arasında bakır oksit nanopartikülleri (Cu NP) en yaygın kullanılan nanopartiküllerdir. Cu NP makinelerde ısı transfer akışında (Chang vd., 2005), polimerler, plastikler ve gaz sensörlerinde (Li vd., 2007), ahşap koruma ve basım makinelerinin elektronik aksamalarında (Lee vd., 2008) ve mikroçip ve pillerin kapla-

\*Sorumlu yazarın e-posta adresi: [btuncsoy@atu.edu.tr](mailto:btuncsoy@atu.edu.tr)

masında (Dhas vd., 1998) yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak antimikrobiyal özellikleri nedeniyle Cu NP bazı cilt bakım ürünleri ve tekstilde de kullanıldığı bilinmektedir.

Çalışmada model organizma olarak kullanılan *Galleria mellonella* L., arıcılık yapılan bölgelerde, arı kovanlarında, peteklerde ve depolanmış bal mumunda büyük zararlar vermekte ve verimin düşmesine neden olmaktadır. *G. mellonella* larvalarının ticari yönden üretime uygun olması, oda sıcaklığında üretiminin kısa sürede yapılabilmesi ve ucuz olması, ayrıca etik sorunlara yol açmaması bu türü deneysel çalışmalarda kullanılan diğer türlerden ayırt etmektedir. Bunun yanı sıra, *G. mellonella*'nın memelilerle benzer doğal bağışıklık sistemine sahip olması da onun uygun bir model organizma olabildiğini göstermektedir.

Bu amaç kapsamında, *G. mellonella* son evre larvalarının orta barsak ve yağ dokularında bakır oksit nanopartiküllerinin subletal konsantrasyonunun protein, glikojen ve lipit miktarları ile hemosit sayıları üzerine etkileri belirlenmiştir.

## 2. Gereç ve Yöntem

### 2.1. Böcek Kültürü

*G. mellonella* larvaları,  $28 \pm 2$  °C sıcaklık ve  $\%65 \pm 5$  bağıl neme sahip laboratuvar koşullarında yarı sentetik besin kültüründe yetiştirildi (Bronskill, 1961). Hazırlanan besin içinde son evreye gelen larvalar besin ortamından alınarak deneyde kullanıldı (n=20). Deney kaplarının üst kısımları hava sirkülasyonunu sağlamak amacıyla eşit miktarda delindi. Kontrol ve uygulama grupları, 72 saatlik deney süresi tamamlanana kadar her gün ölüm olup olmadığının tespiti için kontrol edildi.

### 2.2. Toksikite Testi

Besin ortamından alınan üçüncü evre larvalar, kontrol grubu ve uygulama grupları olmak üzere iki gruba ayrılarak, içerisinde bakır oksit nanopartiküllerinin 0.1 ve 10000 mg/L konsantrasyonlarının olduğu besin ortamına aktarıldı. Uygulama yapılan gruplarda  $\%100$  ölüm olana kadar denemeler devam ettirildi, tüm böceklerin öldüğü gün ve derişimlere göre probit analizi yöntemiyle, CuO NP' in *G. mellonella* larvaları için LD değerleri SPSS 21 istatistik programı kullanılarak hesaplandı (Finney, 1971). Uygulama yapılan her bir grupta 20 adet larva yer aldı.

### 2.3. Deney Sistemlerinin Hazırlanması

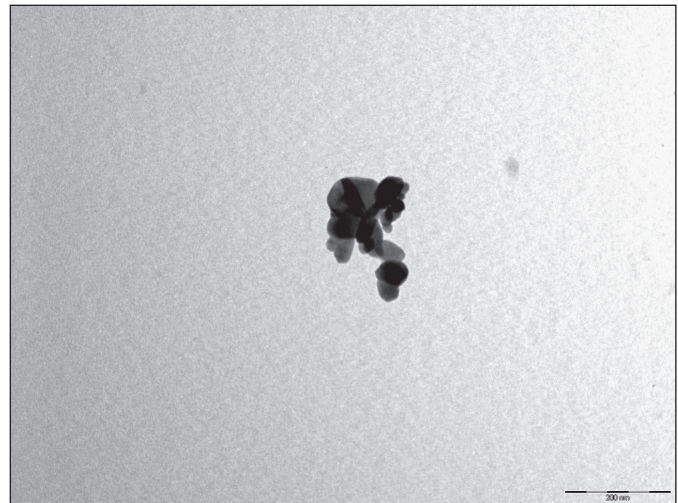
Stok kültürden alınan 3. evre larvaların, içerisinde CuO NP' nin LD<sub>50</sub> konsantrasyonunu içeren deney kaplarında

beslenmeleri sağlandı. Son evreye gelen larvalar deney ortamından alınarak buz üzerinde 2-3 dakika bekletildikten sonra,  $\%95$  etil alkol ile dezenfekte edildi. Daha sonra larvalar sırt kısmı strafora gelecek şekilde sabitlenerek birinci çift torasik bacaklarının önünden orta eksen boyunca uzunlamasına mikro makas (Bahadır, düz makas, 16 cm) ile kesildi. İlk önce yağ doku bir pens yardımıyla izole edildi, daha sonra orta barsak ayrıldı. İzole edilen yağ doku ve orta barsak, içerisinde homojenizasyon tamponu (20 mM; pH 7.6) bulunan ependorf tüplere aktarıldı. Orta barsak Ultra Turrax marka homojenizatörde 5 dakika süreyle, yağ doku ise ultrasonik homojenizatörde (10 sn., 30 W) homojenize edildikten sonra, 12.000 g,  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de, 45 dk. süreyle santrifüj edildi. Bu işlem sonunda elde edilen supernatant, analizler yapıncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı.

### 2.4. Bakır Oksit Nanopartikül Karakterizasyonu

Deneylerde partikül büyüklüğü 50 nm'den küçük olan bakır oksit nanopartikülü (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. CuO NP çözeltinin derişimi 100 mg/L olacak şekilde ultra saf su hem içerisinde çözülmüştür. Elde edilen karışım analizden hemen önce 15 dakika süreyle ultrasonik banyoda sonikasyona bırakılmış ve ardından analiz işlemine geçilmiştir.

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizleri için ultra saf su ile hazırlanan 100 mg/L CuO NP sonikasyona bırakılmış ardından üzeri karbon tabaka ile kaplanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Partikül boyut aralığı JEOL (JEM-1011) mikroskopta görüntü analiz yazılımı (Soft Imaging System) kullanılarak rastgele seçilmiş 60 nanopartikül analizi ile belirlenmiştir.



**Şekil 1.** CuO NP'nin Transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü.

**Çizelge 1.** CuO nanopartikül karakterizasyonu (Ortalama  $\pm$  Standart hata).

Partikül özelliği	Metod	Ultra saf su
Boyut (nm)	TEM	< 50 <sup>a</sup>
Partikül Boyut dağılımı (nm)	TEM	33.0 $\pm$ 8.3 <sup>b</sup>
Hidrodinamik çap (nm)	DLS	586.6 $\pm$ 89.4 <sup>b</sup>
Zeta potansiyeli (mV)	ELS	-17.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Sigma-Aldrich, <sup>b</sup>100 mg/L CuO NP.

## 2.5. Total Glikojen Miktarının Saptanması

Glikojen özütlerinin hazırlanmasında, barsak ve yağ dokunun homojenizasyon ve santrifüj işlemlerinden sonra elde edilen supernatanta iki katı kadar %96'lık etil alkol ilave edildi ve 37°C' de 24 saat süre boyunca bekletildi. Süre sonunda 3500 g' de 30 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda supernatant kısım atılarak kalan pellet içerisindeki total glikojen miktarı spektrofotometrik yöntemle 620 nm. dalga boyunda belirlendi (Roe vd., 1961).

## 2.6. Total Protein Tayini

Protein miktarının tayininde bovin serum albüminin substrat olarak kullanıldığı Bradford (1961) yöntemi uygulandı. Renklendirilmiş çözeltilinin absorbanı 595 nm. dalga boyunda ölçüldü.

## 2.7. Lipit Miktarının Tayini

Lipit miktarının tayininde Van Handel (1985) metodu kullanıldı. 200 mL supernatant kloroform/metanol (1:2) ile karıştırıldı ve 90°C su banyosunda buharlaşmaya kadar ısıtıldı. Daha sonra, 40 µl konsantre sülfürik asit çözeltisi ilave edildi ve üzerine 960 µl vanilin-fosforik asit reaktifi eklendi. Absorbans değerleri spektrofotometrik yöntem ile 525 nm. dalga boyunda okundu. Standart olarak %0.1' lik soya yağı kullanıldı.

## 2.8. Hemolenfin Elde Edilmesi ve Total Hemosit Sayısı

Deney ortamından alınan son evre larvalar hareketlerinin yavaşlaması amacıyla 3 dk. buz üzerinde bekletildi. Daha sonra, larvalar %95'lik etanol ile dezenfekte edildi ve birinci arka bacak üstünden ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinip mikropiller tüp (SIGMA) yardımıyla 5 µl hemolenf elde edildi. Hemolenf, melanizasyona izin vermeden hızlı bir şekilde daha önce alkolle temizlenmiş lamalar üzerine alınarak yayıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra fiksasyon işlemi için lamalar 5 dakika süre ile metanol: asetik asit (3:1) çözeltisi içinde bekletildi. Boyama çözeltisinin

hazırlanabilmesi için, 3 ml giemsa boya solüsyonu, içerisinde 57 ml PBS (pH 7.4) bulunan lam boyama kaplarına yavaşça damlatılarak karıştırıldı ve 10 dakika bekletildi. Tespit işleminden sonra kurutulan lamalar giemsa boya çözeltisi içine alınarak 15 dakika süresince boyanmaları sağlandı. Kuruma işleminden sonra ksilolden geçirilerek tekrar kurumaya bırakıldı. Daha sonra, entellan ile kapatılarak Leica DM750 marka mikroskopta hemosit tipleri belirlenerek sayım işlemi yapıldı.

Elde edilen hemolenf örneğinden 4 µl alınarak, buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 36 µl antikoagulant (0.098 M NaOH, 0.186 M NaCl, 0.017 M Na<sub>2</sub>EDTA ve 0.041 M Sitrik asit, pH=4.5) bulunan ependorf tüplerine aktarılmıştır. 1:10 oranında seyreltme yapılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresine yüklenmiştir. Hemositler, Leica DM750 marka mikroskopta sayılarak, bir mililitre hemolenfteki hemosit sayısı belirlenmiştir. Sayılan hemositler, Jones (1962) metodu kullanılarak hesaplanmıştır.

## 2.9. İstatistiksel Analizler

Kontrol grubu ve CuO NP uygulanmış gruplar arasındaki istatistiksel veriler SPSS 21.0 bilgisayar programında t testi kullanılarak değerlendirilmiştir. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 3. Sonuçlar

### 3.1. Toksikite Testi

*G. mellonella* son evre larvaları için CuO NP' nin LD<sub>50</sub> değeri 136 µg/ml olarak belirlenmiştir. %95'lik güvenilirlik limitleri 63-299 µg/ml değerleri arasında tespit edilmiştir.

### 3.2. CuONP'nün LD<sub>50</sub> konsantrasyonunun *G. mellonella* Orta barsak ve Yağ Dokusunda Protein, Glikojen ve Lipit Miktarına Etkileri

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, *G. mellonella* orta barsak ve yağ dokusundaki protein miktarları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

CuO NP' in LD<sub>50</sub> konsantrasyonunu içeren besin ile beslenen larvaların orta barsak ve yağ dokusunda glikojen miktarında kontrol grubuna kıyasla sırasıyla % 39.3 ve % 13.6 oranlarında azalma gözlemlenmiştir (p<0.05) (Çizelge 2, Şekil 3).

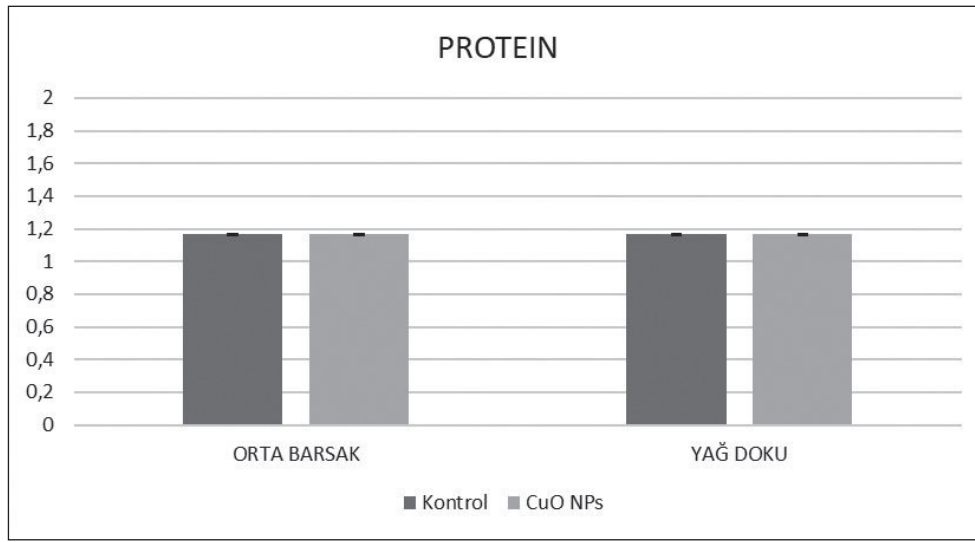
CuO NP' in LD<sub>50</sub> konsantrasyonunda besin ile beslenen larvaların orta barsak ve yağ dokusundaki lipit miktarlarında kontrol grubuna kıyasla sırasıyla % 24.6 ve % 33.7 oranlarında azalma tespit edilmiştir (p<0.05) (Çizelge 2, Şekil 4).

**Çizelge 2.** CuO NP' nün LD<sub>50</sub> konsantrasyonunun *G. mellonella* larvalarının protein, glikojen ve lipit miktarları üzerine etkileri.

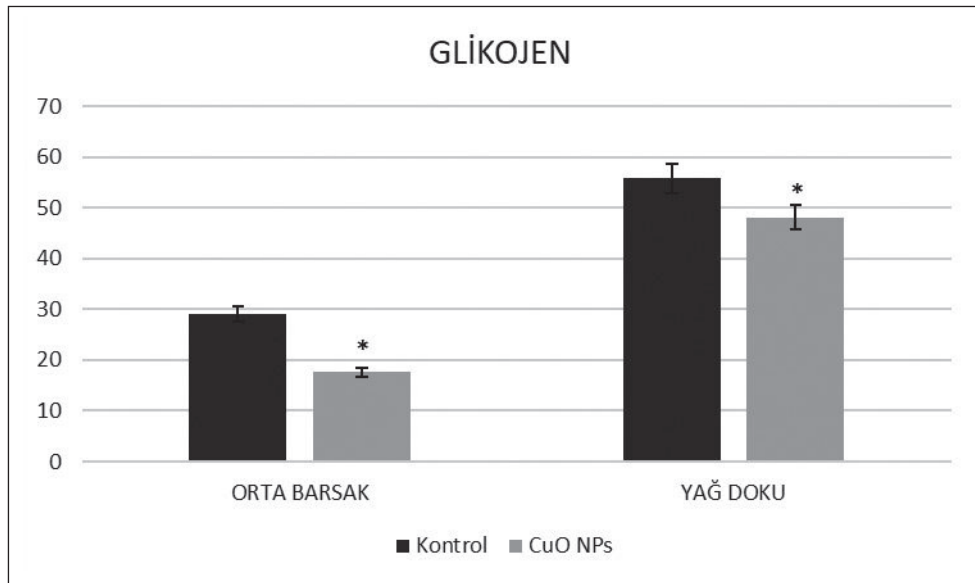
Konsantrasyon (µg/mL)	Protein Miktarı (mg/protein) (Ort ± SH)		Glikojen Miktarı (mg/protein) (Ort ± SH)		Lipit Miktarı (mg/protein) (Ort ± SH)	
	Orta Barsak	Yağ Doku	Orta Barsak	Yağ Doku	Orta Barsak	Yağ Doku
<b>Kontrol</b>	1.169±0.0003 a	1.169±0.0005 a	29.07±1.208 a	55.77±1.135 a	63.36±0.909 a	84.92±0.138 a
CuO NP	1.168±0.0001 a	1.168±0.0001 a	17.64±1.7222 b	48.15±0.537 b	47.74±0.210 b	56.26±2.194 b

(Ort ± SH): 3 tekrarın ortalaması,

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistik ayırım vardır (*t* testi).



**Şekil 2.** CuO NP' nin LD<sub>50</sub> konsantrasyonunu içeren besinin, *G. mellonella* protein miktarına etkileri.



**Şekil 3.** CuO NP' nin LD<sub>50</sub> konsantrasyonunu içeren besinin, *G. mellonella* larvalarında glikojen miktarına etkileri.

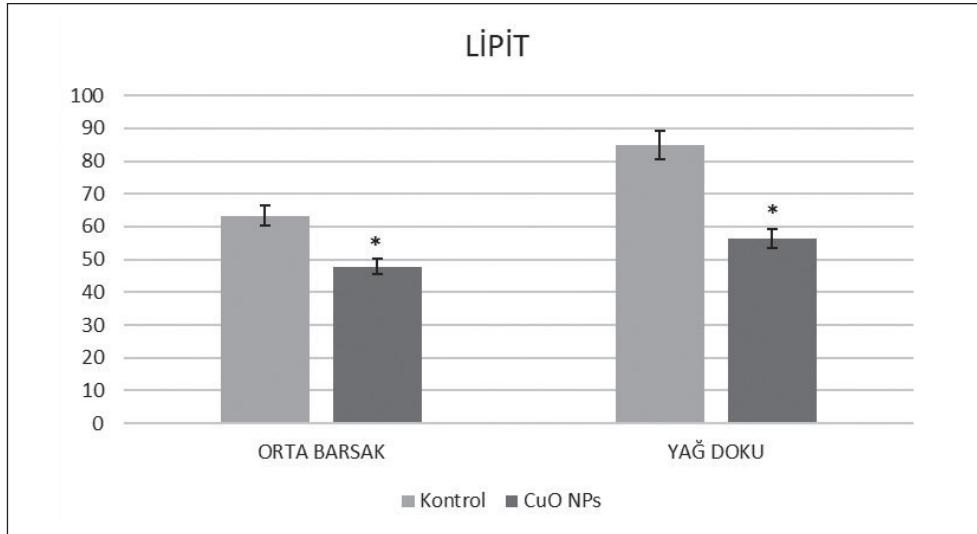
### 3.3. CuONP'nün LD<sub>50</sub> konsantrasyonunun *G. mellonella* hemolenfindeki total hemosit sayısı üzerine etkileri

CuO NP' nin LD<sub>50</sub> konsantrasyonunu içeren besin ile beslenen larvaların hemolenfinde total hemosit sayısında kontrol grubuna oranla azalma meydana gelmiştir (p<0.05) (Şekil 5).

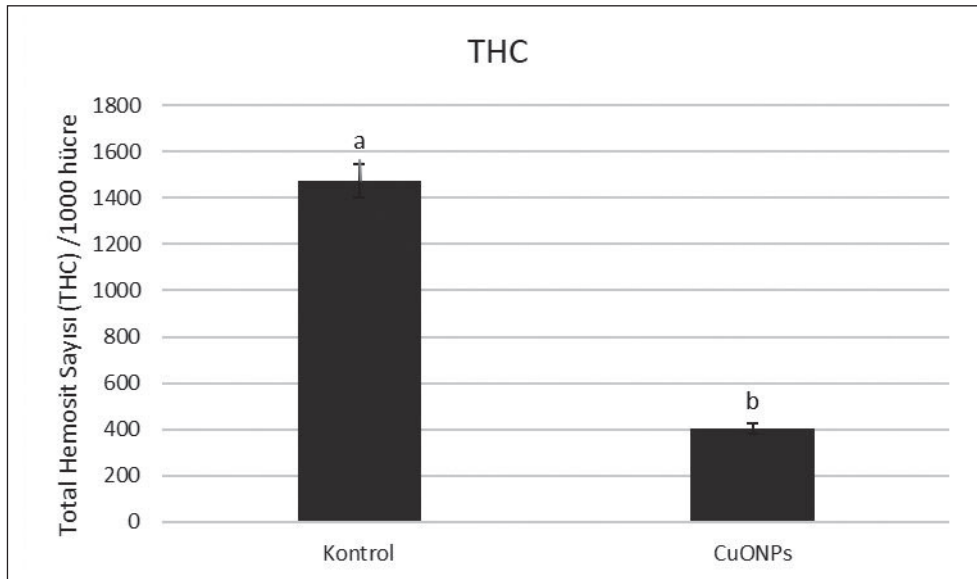
### 4. Tartışma ve Öneriler

Enerji kaynakları olarak besin maddelerinin, total karbonhidratların, lipitlerin ve proteinlerin miktarı böcek popülasyonunu büyük ölçüde etkilemektedir (Hogervorst vd., 2007). Bunların arasında ağır metal toksisitesinin belirlenmesinde en önemli parametrelerden biri glikojendir.

(Dadd, 1985, Lagadic vd., 1994). Glikojen, yüksek metabolik ve fizyolojik aktivite sonucunda dokularda birikmekte ve kontaminasyon seviyesini belirlemektedir (Lagadic vd., 1994). Lipitler ise böcekler için yumurta üretiminde ve enerji kaynağı olarak görev yapmaktadır (Ryan ve Van der Horst 2000). Vücuttaki rezervler için kullanılan lipitlerin miktarı, besinlerin yakalanması ile büyüme ve üreme gibi prosesler tarafından rezerv talepleri arasındaki dengenin bir sonucu olarak gözükmekte ve bu denge herhangi bir toksik ürün tarafından bozulabilmektedir (Canavoso vd., 2001). Ayrıca böcekler, ağır metallerin ekosistemdeki biyobirikimi ve biyotransferi ile ilgili çalışmalarda biyoindikatör olarak kullanılmaktadır (Banville vd., 2012, Dere, 2015). Ağır metallerin vücuda alınması sonucunda



Şekil 4. CuO NP'nin LD<sub>50</sub> konsantrasyonunu içeren besinin, *G. mellonella* larvalarında lipit miktarına etkileri.



Şekil 5. CuO NP'nin LD<sub>50</sub> konsantrasyonunu içeren besinin, *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki total hemosit sayısı üzerine etkileri.

meydana gelen toksisiteye karşı oluşan yanıtın ağır metalin türüne, konsantrasyona, böceğin türüne, gelişim evresine bağlı olarak değişmekle birlikte, toksisite sonucunda oluşan fizyolojik etkilerin de gelişmeyi, büyümeyi, yaşam süresini, üretkenliği, yumurta verimini ve yumurta açılımını azalttığı bilinmektedir. (Moe vd., 2001, Cervera vd., 2004, Wu vd., 2006).

Yapılan çalışmada, CuO NP' nin LD<sub>50</sub> konsantrasyonunun *G. mellonella* orta barsak ve yağ dokusundaki protein miktarında istatistiki olarak bir değişime neden olmadığı, glikojen ve lipit miktarlarında ise azalma meydana getirdiği belirlenmiştir. Organizmalardaki metabolik süreçler toksik maddeler tarafından önemli derecede etkilenmektedir. Enerji metabolizması ağır metallerin neden olduğu stres ile baş etmede önemli rol oynamaktadır. Böceklerde ağır metallerin metabolik faaliyetler üzerine etkileri ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmakla birlikte, nanopartiküllerin etkileri ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Spring vd. (1977)'a göre ağır metal toksisitesi sonucunda glikojen miktarındaki azalma adaptif mekanizma olan glikolizis ile ilgilidir. Emre vd. (2013), *G. mellonella* larvaları ile yaptıkları bir çalışmada artan kadmiyum konsantrasyonuna bağlı olarak protein, lipit ve glikojen miktarlarında azalma meydana geldiğini bildirmiştir. *Lymantria dispar* (L.) larvalarında ağır metal uygulaması sonucunda hemolenf ve total vücut dokusunda trehaloz ve glikojen miktarlarında önemli derecede azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Bischof, 1995). Herhangi bir toksisite sonucunda organizmadaki fizyolojik olaylara bağlı olarak, lipit ve karbohidratlar böcek vücudunda depolanabilmekte veya enerji kaynağı olarak kullanılabilir (Miranda vd., 2003). Bu nedenle, glikojen miktarındaki azalma CuO NP' nin detoksifikasyonunun bir sonucu olarak meydana gelmiş olabilir. Yapılan çalışmada lipit miktarında meydana gelen azalmanın nedeninin ise, organizmaların çevresel kontaminasyonlara maruz bırakıldıklarında lipitlerin ilk enerji kaynağı olarak kullanılması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, lipit miktarındaki azalmanın artan lipid peroksidasyon seviyesine bağlı olarak hücre membranında oluşan oksidatif hasar nedeniyle meydana gelmiş olabileceği de düşünülmektedir (Novais vd., 2013). *Glyphodes pyloalis* ile yapılan çalışmaya göre, TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerine maruz kalması sonucunda total lipit ve karbohidrat miktarlarının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Memarizadeh vd., 2014). Amorim vd. (2012), *Enchytraeus albidus* türünde enerji kaynaklarının (lipitler, karbohidratlar ve proteinler) CuO NP maruziyeti sonucunda azaldığı bildirilmiştir. Enerji kaynaklarındaki azalma ayrıca hem azalan besin

tüketiminden hem de artan metabolik aktivite nedenleriyle de meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir (De Coen ve Janssen, 2003, Novais vd., 2013). Li vd. (2011) göre, TiO<sub>2</sub> ve Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikülleri, *Ceriodaphnia dubia*' nin enerji asimilasyonunu ve enerji tüketimini önemli derecede engellemiştir.

CuO NP' nin *G. mellonella* larvalarında hemosit sayısı üzerine etkilerinin de incelendiği çalışmada, CuO NP' nin LD<sub>50</sub> konsantrasyonuna maruz kalan larvaların total hemosit sayısında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Zorlu vd. (2015) *G. mellonella* larvalarında TiO<sub>2</sub> NP' nin hemositler üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada total hemosit sayısında azalma meydana getirdiğini belirlemişlerdir. İnsektisitler ve ağır metaller gibi böceklerde toksik etkilere neden olan kimyasal faktörler hematopoietik organlardan hemositlerin salınımını baskılamakta ve bu organların fonksiyonlarının inhibisyonu sonucunda sitotoksik etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, böcek vücuduna giren metal oksit nanopartikülünün enkapsülasyon ve nodül oluşumuna neden olduğu ve hemositlerin kümeleşmesine yol açarak total hemosit sayısında azalma meydana getirdiği düşünülmektedir. Ayrıca, yaptığımız çalışmada, hemosit sayısındaki azalmanın glikojen ve lipit miktarlarındaki azalma ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Hemositler, intermediyer metabolizmanın ve metabolitlerin depo edildiği yerdir. Karbohidratlar, hemositlerde mukin (doğal glikoproteinler) olarak ya da sülfat veya sialik asit kalıntıları ile asidik formda depo edilirler. Babers (1941), *Prodenia* larvaları ile yaptığı bir çalışmada glikoz ve nişastadan oluşan besin ile beslendiğinde glikojenin hemositler ve plazma arasında yayılarak hemositlerde biriktiğini bildirmişlerdir. Yeager ve Munson (1942) *Prodenia eridania* larvalarında arsenik, florit ve merkür kloridin kan hücrelerindeki glikojen miktarında azalma meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada hemosit sayısındaki azalmanın aksine *Spodoptera littoralis* larvaları ile yapılan bir çalışmada, Ag NP ve ZnO NP' nin larva ve pupa evrelerinde total hemosit sayısında artış meydana getirdiğini, total protein, karbohidrat ve lipit miktarlarında ise azalma görüldüğünü bildirmişlerdir (İbrahim ve Ali 2018). Borowska ve Pyza (2011), ağır metallerin hemositler üzerindeki toksik etkilerinin ve etki seviyelerinin; metal tipine, maruz kalınan doza, metalin organizmaya alınma şekline ve diğer çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, CuO NP' nin subletal konsantrasyonunun *G. mellonella* son evre larvalarında metabolik faaliyetler ve immün sistem üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu tespit edilmiştir.

## 5. Kaynaklar

- Amelia, M., Lincheneau, C., Silvi, S., Credi, A. 2012.** Electrochemical properties of CdSe and CdTe Quantum Dots. *Chem. Soc. Rev.*, 41:5728- 5743. Doi:10.1039/C2CS35117J
- Amorim, MJB., Gomes, SIL., Soares, AMVM., Scott-Fordsmand, JJ. 2012.** Energy basal levels and allocation among lipids, proteins, and carbohydrates in *Enchytraeus albidus*: changes related to exposure to Cu salt and Cu nanoparticles. *Water Air Soil Pollut.* 223, 477-482. Doi: 10.1007/s11270-011-0867-9
- Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Kluttgen, B., Christensen, FM. 2011.** Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health lessons learned from four case studies. *Environ. Int.*, 37(6):1143-1156. Doi: 10.1016/j.envint.2011.02.005.
- Babers, FH. 1941.** Glycogen in *Prodenia eridania*, with special reference to the ingestion of glucose. *J. Agric. Res.* 62:509-530.
- Bischof, C. 1995.** Effects of heavy metal stress on carbohydrate and lipid concentrations in the haemolymph and total body tissue of parasitized *Lymantria dispar* L. larvae (Lepidoptera). *Comp. Biochem. Physiol.* 112C: 1, 87-92. Doi: 10.1016/0742-8413(95)00079-8
- Borowska, J., Pyza, E. 2011.** Effects of heavy metals on insect immunocompetent cells. *J. Insect Physiol.* 57: 760-770. Doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.02.012
- Bradford, M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254. Doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Bronskill, J. 1961.** A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Lep. Soc.*, 15: 102-104. Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Canavoso, LE., Jouni, ZE., Karnas, KJ., Pennington, JE., Wells, MA. 2001.** Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutr.*, 21: 23-46. Doi: 10.1146/annurev.nutr.21.1.23
- Cervera, A., Maymo, CA., Sendra, M., Martinez-Pardo, R., Garcera, MD. 2004.** Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae). *J. Insect Physiol.* 50: 737-749. Doi: 10.1016/j.jinsphys.2004.06.001
- Chang, H., Jwo, C., Lo, C., Tsung, T., Kao, M., Lin, H. 2005.** Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by ASNSS. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 10:128-132.
- Dadd, RH. 1985.** Nutrition: organisms, in G. A. Kerkut and L. I. Gilbert [eds.], *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon, Oxford, United Kingdom. pp. 313-390.
- De Coen, W., Janssen, CR. 2003.** The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environ. Toxicol. Chem* 22, 1632-1641. Doi: 10.1897/1551-5028(2003)22<1632:TM BLRB>2.0.CO;2
- Dhas, NA., Raj, CP., Gedanken, A. 1998.** Synthesis, characterization, and properties of metallic copper nanoparticles. *Chem. Mater.* 10:1446-1452. Doi: 10.1021/cm9708269
- Emre, İ., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O., Cogun, HY. 2013.** Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106(3):371-377. Doi: 10.1603/AN12137
- Finney, DJ. 1971.** Probit Analysis. 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge. Doi: 10.1002/jps.2600600940
- Hogervorst, PAM., Wäckers, FL., Romeis, J. 2007.** Effect of honeydew sugar composition on the longevity of *Aphidius ervi*. *Entomol. Exp. Appl.* 122: 223-232. Doi: 10.1111/j.1570-7458.2006.00505.x
- Ibrahim, AMA, Ali, AM. 2018.** Silver and zinc oxide nanoparticles induce developmental and physiological changes in the larval and pupal stages of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Asia-Pac. Entomol.* 21(4):1373-1378. Doi:10.1016/j.aspen.2018.10.018
- Jones, JC., 1962.** Current Concepts Concerning Insect Hemocytes. *Am. Zool.*, 2:209-246.
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F. 1994.** The role of biomarkers in environmental assessment. Invertebrate populations and communities. *Ecotox.* 3: 193-208. Doi: 10.1007/BF00117084
- Lee, Y., Choi, JR., Lee, KJ., Stott, NE., Kim, D. 2008.** Large-scale synthesis of copper nanoparticles by chemically controlled reduction for applications of inkjet-printed electronics. *Nanotechnol.*, 19:7. Doi: 10.1088/0957-4484/19/41/415604
- Li, Y., Liang, J., Tao, Z., Chen, J. 2007.** CuO particles and plates: synthesis and gas-sensor applications. *Mater. Res. Bull.* 43:2380-2385. Doi: 10.1016/j.materresbull.2007.07.045
- Li, M., Czymmeki KJ., Huang, CP. 2011.** Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: a dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution. *J. Hazard. Mater.* 187(1-3):502-508. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.061
- Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Adeli M., Talebi-Jahromi, K. 2014.** Cellular energy allocation of *Glyphodes pyloalis* (Lep.: Pyralidae): changes related to exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *J. Entomol. Soc. Iran*, 33(4): 43-54.

- Miranda, JE., Bortoli, SA., Takahashi, R., Silva, AF. 2003.** Nutritional indexes of silkworm (*Bombyx mori* L.) treated with juvenile hormone analogues. *Revista do Centro de Ciências Rurais* 8, 32-38.
- Moe, SJ., Stenseth, NC., Smith, RH. 2001.** Effect of a toxicant on population growth rates: sublethal and delayed responses in Blow fly populations. *Funct. Ecol.*, 15, 712-721. Doi: 10.1046/j.0269-8463.2001.00575.x
- Novais, SC., Amadeu, MVMS., De Coen, W., Amorim, MJB. 2013.** Exposure of *Enchytraeus albidus* to Cd and Zn changes in cellular energy allocation (CEA) and linkage to transcriptional, enzymatic and reproductive effects. *Chemosphere* 90, 1305-1309. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.09.030
- Roe, HJ., Batley, JM., Gray, RR., Robinson, JN. 1961.** Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *J. Biol. Chem.*, 236, 1224-1246.
- Ryan, RO., Van der Horst, DJ. 2000.** Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 233-260. Doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.233
- Schrand, AM., Rahman, MF., Hussain, SM., Schlager, JJ., Smith, DA., Syed, AF. 2010.** Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(5):544-568. Doi: 10.1002/wnan.103
- Spring, JH, Matthews, JR, Downer, A. 1977.** Fate of glucose in the haemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* 23: 525-529. Doi: 10.1016/0022-1910(77)90264-5
- Tang, F., Li, L., Chen, D. 2012.** Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv. Mater.* 24:1504-1534. Doi: 10.1002/adma.201104763
- Van Handel, E. 1985.** Rapid determination of total lipid's mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 1: 302-304
- Wu, GX., Ye, GY, Hu, C., Cheng, JA. 2006.** Accumulation of cadmium and its effects on growth, development and hemolymph biochemical compositions in *Boettcherisca peregrina* larvae (Diptera: Sarcophagidae). *Insect Sci.*, 13, 31-39. Doi: 10.1111/j.1744-7917.2006.00065.x
- Yeager, JF, Munson SC. 1942.** Changes induced in the blood cells of the southern armyworm *Prodenia eridania* by the administration of poisons. *J. Agri. Res.* 64:307-332.
- Zorlu, T., Nurullahoğlu, ZU., Kaya, S. 2015.** Effects of titanium dioxide nanoparticles on hemocytes of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). ICOCCE-Cappodocia, Nevşehir, Turkey, May 20-23.