

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



POLİSTİREN TEMELLİ MİKROPLASTİKLERİN MODEL
ORGANİZMA *Galleria mellonella* HEMOSİT ARACILI BAĞIŞIKLIK
VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

SERANAY ÖZGEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Aylin ER (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Olga SAK
Dr. Öğr. Üyesi Neslihan DEMİR

BALIKESİR, ARALIK - 2022

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Polistiren temelli mikroplastiklerin model organizma *Galleria mellonella* hemosit aracılı bağışıklık ve antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Seranay ÖZGEN

ÖZET

POLİSTİREN TEMELLİ MİKROPLASTİKLERİN MODEL ORGANİZMA *Galleria mellonella* HEMOSİT ARACILI BAĞIŞIKLIK VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SERANAY ÖZGEN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. AYLİN ER
BALIKESİR, 2022

Mikroplastikler, 5 mm'den küçük plastik parçacıklar olarak tanımlanır ve günümüzün en önemli çevre sorunudur. Yapılan çalışmalar, mikroplastiklerin biyolojik olarak biriktiğini; bağırsak hasarı ve metabolik profillerde değişiklik gibi sorunlara neden olduğunu göstermiştir. Böcek bağışıklık mekanizmalarının araştırılması, memeliler dahil hayvanlarda birçok yönden korunan doğuştan gelen bağışıklık ile ilgili önemli bilgiler sağlar. Bağışıklık çalışmalarında özellikle *Galleria mellonella* larvalarının tercih edilmesinin nedeni, memelilerin doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarına yapısal ve işlevsel olarak benzer bir bağışıklık sisteminin bulunmasıdır. Bu nedenle bu tez çalışmasında mikroplastik maddelerin *G. mellonella*'da oluşturduğu bağışıklık tepkimesinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında literatüre göre dozları belirlenen 1µm boyundaki polistiren parçacıkları mikroenjeksiyon aracılığı ile *G. mellonella* larvalarına enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 24 saat sonra larvalardan hemolenf toplanarak toplam hemosit sayısı, antioksidan enzimler ve fenoloksidaz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Enkapsülasyon-melanizasyon bağışıklık tepkilerinin belirlenmesi için de, mikroplastik enjeksiyonundan 24 saat sonrasında kromatografi boncukları enjekte edilerek 4 ve 24 saat sonrası boncuklar toplanarak incelenmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre mikroplastik enjeksiyonu sitotoksik etkiye neden olarak hemosit sayısını azaltmış, granülositlerin mikroplastik parçalarını fagosite etmesi nedeni ile enkapsülasyon-melanizasyon tepkilerinde azalmaya neden olmuştur. Bunun yanında antioksidan enzim ve fenoloksidaz aktivitesinde değişime neden olmamıştır. Sonuçta mikroplastiklerin sitotoksik etkileri nedeni ile hücre aracılı bağışıklık tepkilerini azalttığı ve bu yönüyle tüm canlıların sağlığı için önemli bir tehdit oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: mikroplastik, *Galleria mellonella*, enkapsülasyon-melanizasyon, fenoloksidaz aktivitesi, antioksidan enzim aktivitesi

ABSTRACT

EFFECTS OF POLYSTYRENE-BASED MICROPLASTICS ON THE MODEL ORGANISM *Galleria mellonella* HEMOCYTE-MEDIATED IMMUNITY AND ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM

MSC THESIS

SERANAY ÖZGEN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

SUPERVISOR: DOÇ. DR. AYLİN ER

BALIKESİR, 2022

Microplastics are defined as plastic particles smaller than 5 mm and are the most important environmental problem lately. Studies have shown that microplastics bioaccumulate; and than cause intestinal damage and changes in metabolic profiles. The investigation of insect immune mechanisms provides important insights into innate immunity, which is conserved in many ways in animals, including mammals. The reason why *Galleria mellonella* larvae are preferred in immune studies is that they have an immune system structurally and functionally similar to the innate immune responses of mammals. For this reason, in this thesis, we aimed to determine the immune reaction caused by microplastic substances in *G. mellonella*. Within the scope of the study, the doses of which were determined according to the literature, 1 µm polystyrene particles were injected into the *G. mellonella* larvae by a microinjector. Hemolymph was collected from the larvae after 24 hours of the injection and the total hemocyte count, antioxidant enzymes and phenoloxidase enzyme activity were examined. In order to determine the encapsulation-melanization immune responses, chromatography beads were injected 24 hours after the microplastic injection and the beads were collected after 4 and 24 hours. According to the results of our study, injection of microplastics caused a cytotoxic effect and decreased the number of hemocyte and it caused a decrease in encapsulation-melanization responses due to phagocytosis of microplastic parts of granulocytes. In addition, it did not cause any change in antioxidant enzyme and phenoloxidase activities. As a result, it was concluded that microplastics reduce cell-mediated immune responses due to their cytotoxic effects, and in this respect, they pose a significant threat to the health of all living things.

KEYWORDS: microplastic, *Galleria mellonella*, encapsulation-melanization, phenoloxidase activity, antioxidant enzyme activities

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1 Böceklerde Bağışıklık Sistemi.....	4
1.1.1 Humoral Bağışıklık.....	5
1.1.2 Hücresel Bağışıklık.....	7
1.1.3 Hemosit Aracılı Bağışıklık Tepkileri.....	7
1.1.4 Antioksidan Enzimler	11
2. MATERYAL VE METHOT	15
2.1 Deney Örneklerinin Yetiştirilmesi.....	15
2.2 Dozların Hazırlanması ve Enjeksiyon	15
2.3 Enkapsülasyon- Melanizasyon	17
2.4 Antioksidan Aktivite Ölçümleri	18
2.4.1 Total Protein (TP) Tayini.....	18
2.4.2 Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini.....	18
2.4.3 Katalaz Aktivitesi (CAT) Tayini	19
2.4.4 Lipid Peroksidaz (LPO) Düzeyi	20
2.4.5 Fenoloksidaz Aktivite Tayini.....	20
2.5 İstatistik.....	20
3. BULGULAR	21
3.1 <i>G. mellonella</i> ' da Toplam Hemosit Sayısı.....	21
3.1.1 Mikroplastığın Enkapsülasyona Etkisi	22
3.1.2 Mikroplastığın Melanizasyona Etkisi	25
3.2 Mikroplastığın Antioksidan Savunma Mekanizması Üzerine Etkisi.....	29
3.2.1 Total Protein Miktarındaki Değişimler	29
3.2.2 Superoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesindeki Değişimler.....	30
3.2.3 Katalaz Enzim (CAT) Aktivitesindeki Değişimler	31
3.2.4 Lipit Peroksidaz (LPO) Aktivitesindeki Değişimler	33
3.2.5 Fenoloksidaz (PO) Enzim Aktivitesindeki Değişimler	34
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
5. KAYNAKLAR	46
EKLER	65
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 MP'ler için olası maruz kalma yolları ve vücut partikül toksisitesi	2
Şekil 2.1 Neubauer Hemositometre Lamı	16
Şekil 2.2 Neubauer hemositometresi sayım alanı	16
Şekil 3.1 Neubauer lamında hücre genel görüntüsü	21
Şekil 3.2 Toplam hemosit sayısı	22
Şekil 3.3 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> enkapsülasyonuna etkilerinin 4. saat sonuçları	25
Şekil 3.4 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> enkapsülasyonuna etkilerinin 24. saat sonuçları	25
Şekil 3.5 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> 4. saat melanizasyonuna etkisi (% değer).....	28
Şekil 3.6 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> 24. saat melanizasyonuna etkisi (% değer)	28
Şekil 3.7 Albumin ile hazırlanan protein standart grafiği	29
Şekil 3.8 Total protein miktarı	30
Şekil 3.9 Superoksit dismutaz enzim aktivitesi	31
Şekil 3.10 Katalaz enzim aktivitesi	32
Şekil 3.11 Lipit peroksidaz enzim aktivitesi	33
Şekil 3.12 Fenoloksidaz enzim aktivitesi	34

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 Protein tayini standart stok çözeltilerinin hazırlanması	18
Tablo 2.2 SOD enziminin tayini için gerekli çözeltiler	19
Tablo 2.3 CAT enzimi tayini için gerekli çözeltiler	19
Tablo 2.4 MDA miktarı tayini için gerekli çözeltiler	20
Tablo 3.1 Toplam hemosit sayısı.....	21
Tablo 3.2 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> enkapsülasyonuna etkisinin 4. saat ve 24. saat sonuçları	24
Tablo 3.3 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> melanizasyonuna etkisinin 4. ve 24. saat sonuçları	27
Tablo 3.4 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> üzerinde total proteine etkisi.....	29
Tablo 3.5 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> üzerinde SOD aktivitesine etkisi	31
Tablo 3.6 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> üzerinde CAT aktivitesine etkisi	32
Tablo 3.7 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> üzerinde LPO aktivitesine etkisi	33
Tablo 3.8 Mikroplastığın <i>G. mellonella</i> üzerinde PO aktivitesine etkisi	34

SEMBOL LİSTESİ

%	:Yüzde oranı
g	:Gram
µl	:Mikrolitre
ml	:Mililitre
ppm	:Milyonda bir
GA₃	:Giberellik Asit
IAA	:İndol-3-Asetik Asit
NaCl	:Sodyum Klorür
NaOH	:Sodyum Hidroksit
PBS	:Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
SH	:Standart Hata
OH	:Hidroksil iyonu
°C	:Santigrat derece
CAT	:Katalaz
cm	:Santimetre
Cu	:Bakır
CuCl₂	:Bakır(II) klorür
LPO	:Lipid peroksidaz
MDA	:Malondialdehit
NBT	:Nitro blue tetrazolium
SOD	:Süperoksit dismutaz
TBA	:2-tiyobarbütirik asit
TCA	:Trikloroasetik asit
TP	:Total protein
XOD	:Ksantin oksidaz
Zn	:Çinko

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarımı yapmamı mümkün kılan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Aylin ER'e içtenlikle teşekkür ederim. Lisansüstü çalışmam süresince yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgisini, sabrını, hoşgörüsünü esirgemeyen ve yanımda olan değerli hocam Sayın Arş. Gör. Dr. Serhat KAYA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Gülsüm AKKUŞ, Melik GÜNAY ve Asena İlayda YETKİN'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen, yanımda olan ve bana her türlü imkanı sağlayan, biricik anneme, babama ve kardeşime ayrıca teşekkür ederim.

Çalışma sürecimde desteği ni benden esirgemeyen ve bu süreçte beni eğitimim konusunda her daim destekleyen sevgili eşim Özgür ÖZGEN'e teşekkür ederim.

Balıkesir, 2022

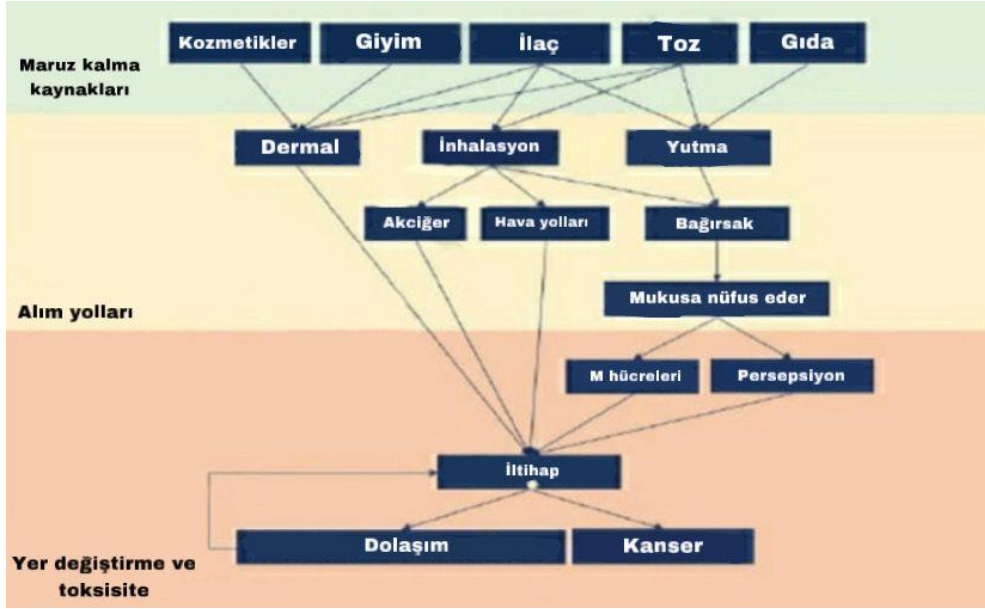
Seranay ÖZGEN

1. GİRİŞ

Plastikler, gıda ürünlerinin ambalajlanmasında, tarak, diş fırçası ve kalem gibi ev eşyalarında ve alışveriş poşetlerinde günlük olarak karşılaşılan, yaşamın her yerinde karşımıza çıkan bir maddedir (Fendall ve ark., 2009). Plastikler çoğunlukla; polipropilen (PP), polietilen (PE), polistiren (PS), polivinilklorür (PVC), polietilen tereftalat (PET), poliamidler (PA) ve benzerleri dahil olmak üzere çok çeşitli polimer türlerinden oluşur. Petrol, doğal gaz veya kömür gibi fosil yakıtlardan elde edilir (Wang ve ark., 2019). Düşük maliyetleri, yüksek oksijen ve nem bariyer özellikleri, hafiflikleri, onları mükemmel ambalaj malzemeleri haline getirir. Cam, metal ve kağıt gibi geleneksel malzemeler, eşdeğer veya farklı tasarıma sahip uygun maliyetli plastik malzemelerle yer değiştirmektedir. Okyanus ortamında bulunan plastik kalıntıların yaklaşık %18'i balıkçılık endüstrisinden kaynaklanır, geri kalanı büyük ölçüde sahil çöpü dahil olmak üzere kara kaynaklı durumlardan elde edilmektedir (Andrady, 2011).

Son zamanlarda önemli bir bulgu olarak, mikroplastik şeklinde adlandırılan küçük plastik kalıntılar, Antarktika da dahil olmak üzere dünya çapında okyanuslarda birikmektedir (Barnes ve ark., 2009; Zarfl ve Matthies, 2010). Mikroplastik ifadesi, çapı 5 mm'den küçük olan plastik parçacıkları tanımlamaktadır (Thompson ve ark., 2004). Yapılan son araştırmalarda, mikroplastiklerin yiyeceklerde, özellikle deniz ürünlerinde yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir (Seltenrich, 2015; EFSA CONTAM Panel, 2016; Santillo ve ark., 2017; Smith ve ark., 2018; Hantoro ve ark., 2019; De-la-Torre, 2020; Mercogliano ve ark., 2020; Walkinshaw ve ark., 2020). Mikroplastikler suda yaşayan organizmalar tarafından bünyelerine alındıktan sonra, besin zincirine girer ve sonunda insan sağlığına tehdit oluşturur (Chang ve ark., 2020; Prata ve ark., 2020; van Raamsdonk ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2020). Aynı zamanda deniz ekosisteminde, okyanusların karadaki yaşamı destekleyen özelliklerini tehlikeye atan ve biyolojik olarak biriken potansiyel kirleticilerdir. Mevcut plastik üretiminin yaklaşık yarısı Asya'da bulunurken, NAFTA ve AB ülkelerinin her biri yaklaşık %20'lik bir paya sahiptir ve ürünün üretim yerlerinde ve nüfus yoğunluğunun yüksek olduğu şehir merkezlerinde plastik çöp daha fazladır, bu yüzden mikroplastikleri oluşturan polimerlerin fiziksel ve yapısal özellikleri, deniz ortamlarında ne kadar ekolojik tehdit oluşturduklarının belirlenmesinde önemli rol oynar (Andrady, 2017). Son yıllarda deniz türlerinde en küçük planktonik hayvanlardan mikrozooplankton, balıklar ve deniz kaplumbağaları dahil olmak üzere en büyük yırtıcı hayvanlara kadar mikroplastik yutulması belgelenmiş (Raju ve ark., 2019) ancak zooplankton, omurgasızlar ve ekinodermiler gibi daha düşük trofik seviyeli organizmalar,

mikroplastığın zararlı etkilerine karşı daha savunmasız görünmektedir (do Sul ve ark., 2014). Mikroplastikler sucul canlılar tarafından yutulduklarında, beslenme organlarını bloke ederek, gıdanın geçişini engelleyerek veya sözde doygunluğa neden olarak küçük sucul organizmalar için mekanik bir tehlike oluşturarak gıda alımının azalmasına neden olabilir (Murphy and Quinn, 2018).



Şekil 1.1; Mikroplastikler için olası maruz kalma yolları ve vücut partikül toksisitesi (Prata ve ark., 2020).

Çok yönlülüğü, dayanıklı yapısı ve yüksek maliyet etkinliği sayesinde plastikler, paketlenme, inşaat, ulaşım, elektrikli ve elektronik cihazlar, tarım, tıbbi tesisler ve spor gibi birçok stratejik sektörde çok önemli bir rol oynamıştır (PlasticsEurope, 2017). Plastik ürünlerin geniş kullanımı, plastik atıkların uygun olmayan şekilde imha edilmesi ve plastik malzemelerin refrakter doğası nedeniyle, plastik döküntüler hem karasal hem de deniz ekosistemlerinde kontrolsüz bir oranda birikmektedir (Rillig, 2012; Barnes ve ark., 2009). Özellikle doğal ortamda hızlı plastik parça birikimi, küresel endişeleri artırmıştır (Cozar ve ark., 2014; Auta ve ark., 2017). Okyanustaki mikroplastiklerle ilgili olarak iki çeşit mikroplastik ortaya çıkmaktadır; birincisi, sentetik polimerler ortamda minimum bozulma ile kaldıkları için (Moore, 2008), plastik döküntüler dalga hareketi, kum öğütme, güneş ışığına maruz kalma (Eriksson ve Burton, 2003) ve sindirim sisteminden geçme nedeniyle art arda daha küçük parçalar haline gelmektedir. Birçok mikroplastik yüzdüğünden, UVB radyasyonuna maruz kalma, plastik polimerlerin kırılma hale gelmesine ve parçalanmasına neden olarak nanopartiküller (Handy ve Shaw, 2007) ve hatta tek tek polimerlere ulaşılan kadar daha küçük parçalar haline gelmektedir (Moore, 2008). Ancak, okyanuslarda çok daha fazla miktarda

bulunan ikincil mikroplastikler, tipik olarak ya sentetik kumaşların yapımı sırasında artan parçalar, tekstil elyaf parçalarını ve tarlada kalan kullanım sonrası tarımsal malç filmlerinin parçalarından ya da hava koşullarının bozulması nedeniyle daha büyük plastik döküntü maddelerinin parçalanmasından türemektedir ve bu tip ikincil mikroplastiklerin okyanuslara ne oranda karıştığını öngörebilmek çok daha zorlayıcıdır; bu sebeple büyük plastik döküntülerin aksine, okyanuslardaki mikroplastiklerin miktarı etkin bir şekilde tespit edilemez, geri dönüşüm için toplanamaz veya hiçbir şekilde ortadan kaldırılamaz (Andrady, 2017).

Deniz ortamının mikroplastik kirliliği, yiyecek ağları içinde yutulması ve taşınması yoluyla çeşitli türler için tehdit oluşturan büyüyen küresel bir sorundur (Sharifinia ve ark., 2020). Mikroplastığın sucul canlılar üzerindeki olumsuz etkilerini destekleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Mikroplastik kaynaklı stres altında, hemolenf ve hepatopankreasta düşük doz veya kısa maruz kalma sürelerinde ilk artıştan sonra bağışıklık ile ilgili faktörlerin çoğunun içeriği veya aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2019). Mikroplastiklerin, konserve deniz ürünleri içeriği, tuz gibi ilave bileşenlerin varlığında arttırılabileceği öne sürülmüştür ve ayrıca, konserve balık örneklerinde en yaygın polimer türünün polietilen tereftalat (%32,8) olduğu açıklanmıştır (Akhbarizadeh ve ark., 2020). Araştırmacılar derin deniz çökeltlerinde, derinliği 1100 ila 5000 m arasında değişen farklı derin deniz habitatlarını temsil eden dört konumda toplanan mikrometre aralığında boyutlandırılmış plastik parçacıklar bulmuşlardır ve mikroplastik kirliliğinin dünyanın okyanuslarına, uzak ve büyük ölçüde bilinmeyen derin denizlere yayıldığını göstermişlerdir (Cauwenberghe ve ark., 2013). Christensen ve arkadaşları (2020), Virginia'daki üç nehirin etrafına bulunan altı bölgede taşkın yatakları ve nehir kanallarındaki mikroplastik kirliliği araştırmışlardır. Mikroplastiklerin taşkın yatağında yoğunlaştığını, diğer doğal ve sentetik parçacıklarla daha büyük agregalar olarak birleştiğini ve okyanus mikroplastiklerinden farklı olabileceği hipotezlerini test etmek için ölçümler yapmışlardır ve taşkın yatağındaki mikroplastik konsantrasyonlarının genellikle taşkın yatağındaki mikroplastiklerin akış kanalına göre daha yüksek oranda olduğunu göstermişlerdir. Limonta ve arkadaşları (2019), mikroplastik toksisitesinin altında yatan biyolojik mekanizmaları daha fazla araştırmak için entegre bir yaklaşım uygulamışlardır ve mikroplastiklerin etkilerini transkriptomik, histolojik ve davranışsal düzeyde analiz etmişlerdir. Yetişkin zebra balığını, yirmi gün boyunca iki konsantrasyonda yüksek yoğunluklu polietilen ve polistiren mikroplastiklere maruz bırakmışlardır. Transkriptomik sonuçlarda, bağışıklık sistemi gen ekspresyonundaki değişikliklerin, lipid metabolizması ve epitel bütünlük ile ilişkili genlerin hücresel düzeyde azalış gösterdiğini belirtmişlerdir. Transkriptomik bulgularında,

doku değişikliklerinde, solungaçlarda ve bağırsak epitelinde gözlenen daha yüksek nötrofil oluşumu ile desteklendiğini söylemişlerdir. Çalışma sonuçlarında, bildirilen transkriptomik ve histolojik bulgular göz önüne alındığında, mukozal epitel bütünlüğü ve bağışıklık yanıtı üzerindeki etkilerin, organizmanın patojenlere karşı savunmasını potansiyel olarak azaltabileceğini ve enerji depolarının farklı bir şekilde kullanılmasına yol açabileceğini varsaymışlardır. Avrupadaki kabuklu deniz ürünleri tüketicilerinin yıllık beslenme maruziyetlerinin yılda 11.000 adet mikroplastik olabileceği öne sürülmüştür (Cauwenberghe ve Janssen, 2014). Deniz ürünlerinde deniz mikroplastiklerinin varlığının, gıda güvenliği için bir tehdit oluşturabileceğini, ancak mikroplastik toksisiteyi tahmin etmenin karmaşıklığı nedeniyle, gıda maddelerindeki mikroplastiklerin oluşturduğu insan sağlığı için potansiyel risklerin tahminlerinin mümkün olmadığından bahsetmişlerdir. İlk kez mikroplastiklerin skleraktin mercanları tarafından yutulduğunu ve Avustralya'nın Büyük Set Resifi'ndeki (GBR) kıyı resiflerine bitişik mercan resif sularında mikroplastiklerin varlığı bildirilmiştir. Merkezi GBR'de kıyıya yakın resiflerin yakınında yürütölen plankton altı çekirdeklerden alınan numunelerin analizi, deniz boyalarında ve balıkçılık şamandıralarında kullanılanlara benzer mikroplastiklerin tüm su örnekleme noktalarında düşük konsantrasyonlarda bulunduğunu ortaya çıkarmışlardır. Yaptıkları deneysel besleme denemelerinde, mercanların mikroplastikleri av zannettiklerini ve deneysel besleme deneylerinde plankton ve *Artemia nauplii* tüketimlerine benzer oranlarda ~ 50 µg plastik 2 cm h⁻¹ kadar tüketebildiklerini ortaya çıkarmışlardır. Yutulan mikroplastiklerin mercan bağırsağı boşluğundaki mezenter dokuya sarılmış olduğunu bulmuşlardır. Bu da yüksek konsantrasyonlarda mikroplastik kalıntılarının yutulmasının potansiyel olarak mercanların sağlığını bozabileceğini düşündürmüştür (Hall ve ark., 2015).

1.1 Böceklerde Bağışıklık Sistemi

Böcek bağışıklık tepkisi, birbirine sıkı sıkıya bağlı iki bileşenden, hücresel ve humoral tepkilerden oluşur (Hultmark, 1993; Hoffmann, 1995). Bu mekanizmalar, omurgasızlarda tek bağışıklık tepkisi olan doğuştan gelen bağışıklık terimi altında toplanır ve omurgalılara bakıldığında, son derece spesifik olan ve her seferinde belirli bir tehde yönelik mekanizmalar içeren ikinci bir savunma hattı olan kazanılmış bağışıklığı geliştirmiştir (Tsakas ve Marmaras, 2010). Patojenlere karşı koruma, öncelikle kütikül, bağırsak ve trakea gibi nüfuz edilmesi zor dokular gibi belirli engellerle başlarken, bağışıklık tepkisi yağ cisimciği ve hemositlerden kaynaklanır (Tsakas ve Marmaras, 2010). Yağ cisimciği, böcek vücut boşluğu olan hemoselin en büyük organıdır ve antimikrobiyal peptitlerin üretimi ve salgılanması için önemli bir bölgedir (Hoffmann, 2003). Hemositler böcek hemolenfinde dolaşır ve belirli soylara

farklılaşan prohemositlerden türeler. Prohemositlerin kök hücre olduğu genel olarak kabul edilsede, dolaşımdaki diğer böcek hemosit sınıflarının çeşitli böceklerde farklılaşması tartışmalıdır (Gupta, 1979). Hemositlerin en yaygın türleri prohemositler, plazmatositler, granüler hücreler, sferül hücreler ve oenositoidlerdir (Ribeiro ve Brehelin, 2006; Wu ve ark., 2016). Bununla birlikte, bazı hemosit türleri tüm böceklerde yaygın değildir ve türler arasında farklılık gösterir (Charalambidis ve ark., 1995; Meister ve Lagueux, 2003). Humoral bağışıklık tepkisi, mikrobiyal enfeksiyon tarafından indüklenen ve ağırlıklı olarak yağ cisimciğinde sentezlenen ve hemolenf içine salınan antimikrobiyal peptitleri kodlayan karakterize edilmiş bağışıklık genlerinin ürünlerine dayanır (Hoffmann, 1995; Gillespie ve ark., 1997; Nakatogawa ve ark., 2009; Shia ve ark., 2009). İntegüment, bağırsak hemositleri ve epitel tabakalar da bu tür moleküllerin sentezini gerçekleştiren yerlerdir (Tsakas ve Marmaras, 2010). Bu genler ya eksprese edilmez ya da enfeksiyondan önce düşük bir oranda yapısal olarak eksprese edilir (Hoffmann, 1995; Engström, 1998). Ek olarak, humoral bağışıklık tepkileri hemolenfin pıhtılaşmasını ve melanizasyonunu düzenleyen enzimatik kaskadların aktivasyonunu ve reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS-RNS) üretimini içerir (Gillespie ve ark., 1997; Bogdan ve ark., 2000; Nappi ve Vass, 2001; Hoffmann, 2003; Mavrouli ve ark., 2005). Hücrel tepkiler hemositler tarafından gerçekleştirilir ve fagositoz, nodülasyon ve kapsüllemeyi içerir (Schmidt ve ark., 2001; Nappi ve ark., 2004; Lamprou ve ark., 2005; Mavrouli ve ark., 2005; Sideri ve ark., 2008).

1.1.1 Humoral Bağışıklık

İstilacı patojenin; bakteri, mantar, hatta virüs olarak; tanınmasını, antimikrobiyal peptitlerin (AMP'ler) hemolenf içine salgılanması izler (Zasloff, 2002; Bulet ve ark., 2004). Bu peptitler esas olarak yağ cisimciği tarafından ve daha az derecede hemositler, deri, bağırsak, tükürük bezleri ve üreme organları tarafından sentezlenir (Nappi ve Ottaviani, 2000). 150'den fazla AMP izolasyonu sağlanarak böceklerde karakterize edilmiştir ve bu moleküller, bozulmaya ve hücre ölümüne yol açan anyonik bakteri veya mantar zararını bağlayan küçük, 12-50 amino asit, katyonik peptitlerdir (Zasloff, 2002; Yount ve Yeaman, 2004). Farklı yapı ve hedef organizmalara (bakteri veya mantar) sahip olmalarına rağmen AMP'ler dört grupta sınıflandırılır (Tsakas ve Marmaras, 2010);

- a) sekropinler,
- b) sistein açısından zengin peptitler,
- c) prolin bakımından zengin peptitler

d) glisin bakımından zengin peptitler.

Sekropinler ilk olarak bakteri enjeksiyonundan sonra *Hyalophora cecropia*'da izole edilmiştir (Hultmark ve ark., 1980; Steiner ve ark., 1981). Bu peptitler, gram pozitif veya gram negatif bakteri bakterileri tarafından septik hasara yanıt olarak üretilir ve hücre zarının proteinlerinin sentezini inhibe ederek hücresel proliferasyonu etkiler (Tsakas ve Marmaras, 2010). Defensinler ve drosomisin, sistein açısından zengin peptitlerdir ve defensinler, plazma zarında hücre lizisine yol açan kanallar oluşturarak çoğunlukla gram pozitif peptitleri yok ederken, drosomisin antifungal aktiviteye sahiptir (Tsakas ve Marmaras, 2010). Dipterisin, sadece diptera türlerinde bulunan ve ataklara benzer 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 ark., 1999).

Böcekler, yaralanma durumunda vücut sıvılarının kaybını önlemek için hemolenfin pıhtılaşması için mekanizmalar geliştirmiştir (Theopold ve ark., 1999). Hamamböceği *Leucophaea maderae*'de hemositler, lipoforinlerin ve vitellogenin benzeri proteinlerin polimerizasyonunu katalize eden kalsiyuma bağımlı bir transglutaminaz salgılar ve bu proteinler, memelilerdeki Von Willebrand pıhtılaşma faktörüne benzer bir fizyolojiye sahiptir (Bohn ve ark., 1994). En belirgin mekanizma, *Drosophila*'da benzer görünen *Lymulus polyphemus*'taki mekanizmadır (Vilmos ve Kurucz, 1998). Buna göre, LPS ve β -1,3-glukan bir serin proteaz zincir reaksiyonunu tetikler ve sonunda hemolenfin pıhtılaşmasına yol açar ve ayrıca serin proteaz, melanizasyon kaskadını aktive eder (Nappi ve ark., 1995; Mavrouli ve ark., 2005; Sideri ve ark., 2008). Bu iki kademelin ara metabolitleri (ön pıhtılaşma enzimleri, melanin türevleri ve reaktif oksijen türleri) toksik istilacı patojenler olduğundan, serin proteazın böcek bağışıklığındaki ikili rolüne dikkat çekmişlerdir (Tsakas ve Marmaras, 2010).

Melanin oluşumuna yol açan melanizasyon, çok çeşitli patojenlere karşı savunmada merkezi bir role sahiptir ve bazı lepidopteran ve dipteran böceklerde yara iyileşmesinin yanı sıra nodül ve kapsül oluşumuna katılır (Lavine ve Strand, 2001; Lavine ve Strand, 2003; Mavrouli ve ark., 2005). Melanizasyon tirozin metabolizmasına bağlıdır ve kısaca, tirozin, aktifleştirilmiş fenoloksidaz (PO) tarafından önemli bir dal noktası substratı olan dopa'ya dönüştürülür; Dopa, ya dopa dekarboksilaz (Ddc) tarafından dopamine dekarboksillenebilir ya da PO tarafından dopakinona oksitlenebilir (Tsakas ve Marmaras, 2010). Dopamin ayrıca önemli bir dal noktası substratıdır, çünkü ya PO yoluyla ya da diğer enzimler yoluyla dopamin türevli metabolitler,

nörotransmisyonu, kütiküler sklerotizasyona, kütiküler bileşenlerin kinon ara ürünleri yoluyla çapraz bağlanmasına, fagositoz, yara iyileşmesi ve çeşitli metabolik yollarda kullanılır (Fearon, 1997; Aderem ve Underhill, 1999; Ling ve Yu, 2005; Marmaras ve Lamprooulou, 2009).

1.1.2 Hücresel Bağışıklık

Böceklerde bulunan en az sekiz tip hemosit vardır: prohemositler, plazmatositler, granüler hücreler, koagülositler, kristal hücreler, sferülositler, oenositoidler ve trombositoidler; ancak böceklerin çoğunda her tür hemosit bulunmaz (Pandey ve Tiwari, 2012). Hemositler, hemolenfte serbestçe dolaşırken veya böceğin sindirim sistemi gibi iç organlarına yapışmış şekilde bulunur (AbdelRahman ve Belland, 2005). Hemolenfteki hemositlerin yoğunluğu, böceğin ömrü boyunca ve ayrıca patojenlerin girişine tepki olarak değişir (Vickers, 2017). Prohemositler, büyük bir çekirdeğe ve bir dizi hücre tipine farklılaşabilen bir bazofilik sitoplazmaya sahip küçük dairesel hücrelerdir (Browne ve ark., 2013). Plazmatositler en sık görülen hemositlerdir, yaprağa benzerler, sitoplazmaları lizozomal enzimler içerir, genellikle granüler hücrelerden daha büyüktürler ve kapsül oluşumunda rol alırlar (Lavine ve Strand, 2002). Granüler hücreler küçük bir çekirdeğe ve sitoplazmada çok sayıda granüle sahipken sferülositler, çok sayıda küçük küresel kapanımlarla birlikte çeşitli farklı şekiller sergiler, oenositoidler büyük, iki çekirdekli, fagositik olmayan hücrelerdir (Browne ve ark., 2013) ve koagülositler pıhtılaşma sürecine katılır (Lavine ve Strand, 2002). Hemositler, insan bağışıklık hücrelerine benzer şekilde, hücresel bağışıklık tepkisi sırasında yabancı maddeyi tanıyabilir ve aynı zamanda kendini öz olmayandan ayırt edebilir (İzzetoğlu, 2012). Lepidopteran böceklerde (örn., *Galleria mellonella* L.) plazmatositler ve granüler hücreler çoğu hücresel savunma tepkisinde yer alırken, *Drosophila*'da bu tepkiler öncelikle plazmatositleri ve lamelositleri içerir (Lavine ve Strand, 2002).

1.1.3 Hemosit Aracılı Bağışıklık Tepkileri

Hemositler, böceklerde fagositoz, nodülasyon, kapsülleme ve melanizasyonun belgelendiği bir dizi savunma tepkisinden sorumludur ve bu süreçler, gen ekspresyonu ve sonucu açısından ayrı bağışıklık tepkileri gibi görünmektedir (Tsakas ve Marmaras, 2010).

1.1.3.1 Fagositoz

Memeli nötrofillerinde olduğu gibi, böceklerdeki fagositik hücrenin (plazmatosit) aktivitesi, mikroorganizmaların kompleman benzeri proteinlerle opsonizasyonu ile sağlanır (Ben-Ami, 2011; İzzetoğlu, 2012). Bir patojen bir fagositik hücre tarafından yutulduğunda, elektronların

sitozolik NADPH'den hücre dışı oksijene yer değiştirmesine neden olan ve süperoksit üretimi ile sonuçlanan zara bağlı bir enzim sistemi aktive olur (Baggiolini ve Wymann, 1990). Oksijen patlaması patojenleri öldürmek için gereklidir, ancak aynı zamanda degranülasyonu takiben enzimlerin salınması nedeniyle enfeksiyon alanında lokal doku hasarına ve enflamatuar tepkilere neden olur (Baggiolini ve Wymann, 1990; Arnhold, 2004). Fagositoz, hedefin sinyalleşmeyi ve efektör yanıtlarını aktive eden yabancı olarak tanınmasına bağlıdır (AbdelRahman ve Belland, 2005). Bazı patojenler, hemositlerin yüzeyindeki diğer reseptörler tarafından tanınmasını artıran bir hedefe bağlanan humoral örüntü tanıma molekülleri tarafından tanınırken alternatif olarak patojenler, örneğin kalrektikülin veya apolipoforin gibi hemosit yüzey reseptörleri tarafından doğrudan tanınabilir (Browne ve ark., 2013). Fagositik sürecin kendisi, hemositin ömründeki son olaylar olan melanizasyon, pıhtılaşma ve enkapsülasyonun aksine, genellikle hemositlere zarar vermez (Vickers, 2017). Fagositozun gerçekleşmesi için opsonik ligandlar patojenin dışındaki moleküllere bağlanır (Browne ve ark., 2013). Ligandlar tanındığında, hücre içinde patojenin içselleştirilmesiyle sonuçlanan hücre içi bir kaskad meydana gelir ve fagositoz süreci lektin aracılı olup lektinler böcek hemolenfinde lizozim ile birlikte bulunur (AbdelRahman ve Belland, 2005). Lizozim, hemositlerde bulunan bir anti-mikrobiyal peptittir (Browne ve ark., 2013). Lektinler yüzeye bağlandıktan sonra plazmatositlere bağlanırlar ve bakteri hücrelerinin fagositozunu indüklerler (AbdelRahman ve Belland, 2005). Lektinler ve lizozim aynı anda hareket eder (Browne ve ark., 2013). Lektinler bakteri hücre yüzeyindeki şekerlere bağlanırken, lizozim peptidoglikan tabakasını parçalayarak şekerlerin salınmasına neden olarak teknoik asit ve lipomannan açığa çıkarır, bunlar da BDL⁻¹ lektinleri tarafından tanınır (AbdelRahman ve Belland, 2005).

1.1.3.2 Nodülasyon

Nodülasyon, birden fazla hemosit bakteri kümelerine bağlandığında meydana gelerek çok sayıda bakterinin hemolenften temizlenmesine izin verirken aynı zamanda böceğin enfeksiyona karşı ana hücrel savunma reaksiyonudur (Browne ve ark., 2013). Hemositler birbirine bağlanmaya başlar ve patojenin etrafında örtüşen bir kılıf oluşmasına neden olur (Lavine ve Strand, 2002). Nodülasyon, profenoloksidazın aktivasyonu ve olgun nodüllerin melanizasyonu ile tamamlanırken insan fagositlerinde eşdeğer bir nodülizasyon süreci meydana gelmez, ancak tamamlayıcı, melanizasyona benzer bir kademeli olay sergiler (Browne ve ark., 2013).

1.1.3.3 Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, istilacı metazoan parazitlere veya parazitoitlere karşı yönlendirilen konak böceklerin birincil hücrel bağışıklık tepkisidir ve konak granüositlerin parazitoid yumurta gibi yabancı bir hedefin yüzeyine bağlanmasıyla başlar (Luo ve Pank, 2006). Bağlanmayı takiben, granüllerinin içeriğini yumurta yüzeyi üzerinde serbest bırakarak, plazmatositlerin bağlanmasını teşvik ederek parçalanır veya degranüle olurlar ve bunu kapsülü oluşturmak için çok sayıda plazmatosit katmanının eklenmesi takip eder (Luo ve Pank, 2006). Kapsül oluşumunun sona ermesi, bir granüosit alt popülasyonu, kapsülün çevresi etrafındaki tek tabakaya yapıştığına meydana gelir (Luo ve Pank, 2006). Ne granüositler ne de plazmatositler bağımsız olarak bir kapsül oluşturamazken (Schmit ve Ratcliffe, 1978; Pech ve Strand, 1996) Lepidoptera enkapsülasyonunda yaygın olarak gözlenirler (Schmidt ve ark., 2001). Böceklerde iki farklı enkapsülasyon türü vardır: esas olarak Lepidoptera'da hücrel enkapsülasyon ve Diptera'da humoral enkapsülasyondur; humoral enkapsülasyon hemositlerle birlikte veya onuz meydana gelebilir ve her zaman fenoloksidaz ile ilişkiliyken hücrel enkapsülasyon melanizasyon olmadan gerçekleşebilir (Browne ve ark., 2013).

Dirençli konaklar genellikle parazitoitleri ve diğer büyük yabancı hedefleri, hemositlerin parazitoit çevresinde çok katmanlı bir hücrel zarf oluşturduğu bir süreç olan enkapsülasyon yoluyla ortadan kaldırır (Salt, 1968; Yoshino ve Vasta, 1996). Yabancı bir madde tespit edildiğinde, kapsül oluşumu için gereken bir sonraki adım, hemositlerin yapışkan olmayan durumdan güçlü yapışkan bir duruma geçmesi için uyarılmasıdır (Schmidt ve ark., 2001). Memelilerde immünositlerin yapışması ve göçüne, yapışma faktörlerinin ekspresyonunu, aktivasyonunu veya taşınmasını koordine eden hem sitokinler hem de hücre yapışması aracılık eder (Schmidt ve ark., 2001). Örneğin kemokinler, integrinler gibi adhezyon moleküllerinin sitoplazmik granüllerden hücre yüzeyine doğru hızlı çıkışını indükleyerek monosit yapışmasını aktive eder (Dewald, 1997). Epidermal doku, yağ cisimciği ve hemositlerin, hemosit adezyonunu indükleyen faktörlerin kaynakları olduğu bildirilmiştir (Chain ve Anderson, 1982; Geng ve Dunn, 1988). Bunlara, yaralandığında epidermal hücrelerden salınan ve hemositlerin hücrel bir pıhtı oluşturmaya neden olan hemokinin adı verilen kısmen saflaştırılmış bir protein dahildir (Cherbas, 1973). Enkapsülasyon teşvik edici faktör (EPF) adlı başka bir faktör kısmen saflaştırılmıştır ve Lepidopteran *Heliothis virescens*'te hemositler tarafından kapsül oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Davies ve ark., 1988). Daha yakın zamanlarda, sitokin plazmatosit yayıcı peptitlerin (PSP1), *Photodes includens* güvesinde tespit edildiği ve plazmatositlerin 3 ± 10 pM konsantrasyonlarda saniyeler içinde yabancı yüzeylere yayılmasını

indüklediğini göstermişlerdir (Schmidt ve ark., 2001). PSP1 hemositlerde, yağ cisimciğinde ve sinir dokusunda eksprese edilen daha büyük bir öncü proteindir (Clark ve ark., 1998). PSP1 doza bağımlı olarak plazmatositlerin yapışmasını indüklerken, granüler hücrelerin yayılmasını bastırır (Strand ve ark., 2000). Granüler hücrelerin bir PSP1 kaynağı olduğu göz önüne alındığında, bu inhibitör etki, granüler hücreler ve plazmatositler arasında kapsül oluşumunun başlatılmasını ve sonlandırılmasını düzenlemeye yardımcı olan bir geri besleme döngüsünün var olduğunu gösterir (Schmidt ve ark., 2001).

Bazı Dipteralar, hemositlerin görünür katılımı olmadan melanotik kapsüller oluştursalar da (Götz, 1986), hemositler, diğer böceklerin çoğunda kapsül oluşumundan açıkça sorumludur. Ancak türler kapsül kalınlığı, kapsüllerin ne kadar hızlı oluştuğu, hemosit tiplerinin kapsül oluşumuna aracılık ettiği ve kapsülün melanize olup olmadığı konusunda önemli farklılıklar sergilediği kapsül morfolojisi taksonlar arasında büyük ölçüde benzerdir (Rowley ve Ratcliffe, 1981; Dunn, 1986; Ratcliffe, 1993; Yoshino ve Vasta, 1996). Parazitoidlerin kapsüllemesi üç aşamadan oluşur; parazitoidin kendini tanınamaması, kapsül oluştururken hemositler arasında güçlü yapışma ve parazitoidin öldürülmesidir. (Strand ve Pech, 1995).

- a) Kendini tanınamama: Bazal membranlar esas olarak hücre dışı adezyon molekülleri olan laminin, kollajen IV ve proteoglikanlardan oluşur (Fessler, 1989; Hortsch ve Goodman, 1991). 1930'ların başlarında, Wigglesworth (Wigglesworth, 1937) *Rhodnius prolixus*'taki dış yara bölgelerine hemositlerin alınmasının bazal membrandaki hasara bağlı olduğunu bildirdi: tek başına epidermal hücrelerin öldürülmesi herhangi bir hemosit tepkisini ortaya çıkarmak için yetersizdi (Strand ve Pech, 1995). *Drosophila melanogaster*'deki melanotik tümör mutantlarının ilgili gözlemleri, yağ cisimciğinin anormal gelişen bölgelerinin hemositler tarafından kapsüllendiğini gösterir ve bu mutantlardaki kapsülleme bölgeleri, bazal membranın normal olarak gelişmediği bölgelerle ilişkilidir (Rizki ve Riski, 1980; Rizki ve Riski, 1983). Omurgalı bağışıklık hücrelerinin yapışmasına ve yerleşmesine aracılık etmede hücre dışı matrisin belirgin rolü göz önüne alındığında, bu moleküllerin omurgasız bağışıklığında daha fazla karakterizasyonu gözlemlenir; tanıma molekülleri ve hemositi düzenleyen sitokinler arasındaki etkileşimi içeren bir davranıştır (Strand ve Pech, 1995). Tanıma, parazitoid üzerindeki yüzey moleküllerini tanıyan reseptörler aracılığıyla doğrudan veya parazitoidin yüzeyini opsonize eden humoral veya hemosit kaynaklı faktörlerin bağlanması yoluyla dolaylı olabilir (Strand ve Pech, 1995). Kapsüllemeyi etkilemek için önerilen bir yüzey özelliği yüküdür; birçok çalışma, pozitif ve nötr yüklü nesnelere, negatif yüklü nesnelere daha kolay kapsüllendiğini bulmuştur (Yoshino ve

Vasta, 1996). Bu farkın nedeni bilinmemektedir, ancak hemositlerin içsel tercihinden ziyade ıslanabilirlik veya tanıma moleküllerinin hedefin yüzeyine bağlanma yeteneği ile daha fazla ilgisi olabilir (Strand ve Pech, 1995). Hemositlerin, plazmanın yokluğunda nesneleri in vitro olarak kapsülledikleri de gösterilmiş olup, bu durum, self-histoyumluluk antijenlerinin yokluğunun veya kendinden olmayanın tanınması için yüzey reseptörlerinin varlığını düşündürür (Pech ve ark., 1994). Bununla birlikte, bu reseptörlerin doğası veya kapsüllemedeki rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir.

- b) Enkapsülasyon sırasında hücre yapışması: Kapsülleme çalışmalarının çoğu, en temel özelliğini gözden geçirir; hemositlerin yapışkan olmayan durumdan güçlü yapışkan duruma geçişi (Strand ve Pech, 1995). Daha önce ima edildiği gibi, yapışmayı içeren birçok fizyolojik sürece, hücre dışı matrisin (ECM) yüksek oranda korunmuş molekülleri ve bunların hücre yüzeyi reseptörleri aracılık eder. Bu nedenle, makul ve test edilebilir bir hipotez, ECM moleküllerinin kapsülleme sırasında hemosit yapışmasına aracılık ettiğidir (Strand ve Pech, 1995). Laminin, kollajen IV, fibronektin ve vitronektin gibi hücre yapışma molekülleri, hücre yapışma tanıma dizisi Arg-Gly-Asp (RGD) içerir (Ruoslahti ve Pierschbacher, 1987; Humphries, 2012). RGD dizisi için hücre yüzeyi reseptörleri, integrin reseptör ailesinin bir alt kümesidir (Hynes, 1992). Çoğu durumda, tek başına RGD dizisini içeren çözümlü peptitlerin eklenmesi hücre yapışmasını engelleyebilir veya bir yüzey üzerinde immobilize edildiğinde hücre bağlanmasını teşvik edebilir (Pierschbacher ve Ruoslahti, 1984; Bunch ve Brower, 1992).
- c) Öldürme mekanizmaları: Enkapsülasyondan sonra parazitoidlerin öldürülmesinden sorumlu faktörler üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Parazitoidler boğulma nedeniyle ölebilir (Salt, 1968; Salt, 1970), öldürme ayrıca kapsüller melanize olursa üretilen toksik kinonlardan veya hidrokinonlardan da kaynaklanabilir (Sugumaran ve Kanost, 1993). Böcekler ve diğer omurgasızlarla yapılan çalışmalar ayrıca antibakteriyel proteinlerin (Ham, 1992) veya süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ara ürünlerinin kapsüller içindeki parazitlerin öldürülmesinde (Adema ve ark., 1993; Toru, 1994) bir rolü olduğunu öne sürmektedir.

1.1.4 Antioksidan Enzimler

Ekzositoz ve degranülasyon yoluyla hemositler tarafından salgılanan ve salınan endojen enzimler, hemositlerin bağışıklık fonksiyonları ile yakın bir bağlantıya sahiptir (Wu ve Yi, 2015). Örneğin, üç tipik antioksidaz olan süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT), patojenlere karşı oksidatif öldürmede önemli bir rol oynayan aşırı reaktif oksijen

türlerini (ROS) ortadan kaldırabilir, ancak aynı zamanda toksiktir (Felton ve Summers, 1995; Wang ve ark., 2001). Aktive edilmiş hemositler, ROS salarak bir "oksidatif patlamaya" uğrayabilir. ROS, hem inorganik hem de organik oksijen iyonları, serbest radikaller ve peroksitleri içerir (Lee ve ark., 2012). Bu moleküller genellikle çok küçüktür ve eşleşmemiş değerlik kabuğu elektronlarının varlığından dolayı oldukça reaktiftir. ROS, hücre sinyalleşmesinde ve konak savunma genlerinin uyarılmasında önemli bir rol oynar (Dalton ve ark., 1999). Omurgasız bağışıklık sisteminin son araştırmaları, ROS'a bağlı bağışıklığın hayatta kalma için önemli olduğunu bulmuştur (Ha ve ark., 2005). "Oksidatif patlama" patojenlere karşı etkili olmakla birlikte, "oksidatif stres" olarak adlandırılan hücrede oksidan ve antioksidan durumu arasındaki dengesizlik nedeniyle ROS üretimi daha fazla arttığında dokularda hasara neden olabilir ve antioksidazlar, oksidatif hasarı hafifletmek için aşırı ROS'u ortadan kaldırabilir (Wu ve Yi, 2015). Böcek hemositlerinde bulunan ve plazmaya salındığı gösterilen iki tipik hidrolaz olan asit fosfataz (ACP) ve alkalın fosfataz (AKP), patojenlerin yüzey moleküler yapısını değiştirerek hemositlerin fagositoz yanıtlarını artırabilir (Cheng ve Butler, 1989).

Çok çeşitli biyotik veya abiyotik stresörler, mitokondri ve kloroplastlardaki elektron taşıma zincirlerinin (ETC) düzensizleşmesine, taşmasına ve hatta bozulmasına neden olabilir ve bu nedenle bitki dokularında reaktif oksijen türlerinin (ROS) hızlı üretimini ve birikmesini indükleyebilir (Poór ve ark., 2018). Bu koşullar altında güçlü oksitleyici bileşikler olan singlet oksijen (O_2), hidroksil radikali (OH), süperoksit radikali ($\cdot O_2$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşabilmekte ve bu nedenle hücre bütünlüğü için zararlı olabilmektedir (Foyer ve Noctor, 2009). Bunlar arasında H_2O_2 en kararlı ROS'tur; yayılabilir ve toksik bir bileşik (oksidatif stresi indükleyen) veya bir sinyal molekülü (antioksidan enzimleri indükleyerek toleransa aracılık eden) olarak hareket edebilir (Vranová ve ark., 2002, Kocsy ve ark., 2013, Van Aken ve Van Breusegem 2015). ROS'un zararlı etkilerini en aza indirmek için bitkiler, örneğin Foyer-Halliwell-Asada döngüsü gibi çeşitli antioksidan sistemler gibi ROS birikimini kontrol edebilen karmaşık savunma mekanizmaları geliştirmiştir (Foyer ve Noctor, 2009).

Balmumu güvesi olarak da bilinen *Galleria mellonella*, Pyralidae familyasından Lepidoptera takımına aittir. Bu güve dünya çapında balık tutmak, sürüngenleri ve kuşları beslemek için ticari olarak temin edilebilir, bu da onları kolayca erişilebilir hale getirir (Kwadha ve ark., 2017). *G. mellonella* modellerini kullanmanın faydaları çoktur. *G. mellonella*, kısa bir yaşam döngüsü ile büyük miktarda yavru üretir ve özel laboratuvar altyapısı olmadan yetiştirilmeleri kolay olduğu

için ucuzdur. Deneş başına birçok hayvan kullanma olasılığı, onları yüksek verimli çalışmalar için uygun hale getirir. Larvaların nispeten büyük boyutlu (12-20 mm) olması, inokülasyonun kesin olarak ölçülmesine izin verirken aynı zamanda doku ekstraksiyonu ve histolojik analiz için kullanımı kolaylaştırır (Cook ve McArthur, 2013; Pereira ve ark., 2020). Daha da önemlisi, *G. mellonella* üzerinde araştırma yapmak için herhangi bir etik onay gerekliliğı yoktur (Tsai ve ark., 2016). *G. mellonella*'nın dört gelişim aşaması ile hızlı bir yaşam döngüsü vardır: yumurta, larva, pupa ve yetişkin güvesi (Jorjão ve ark., 2018). Sıcaklık ve nemdeki farklılıklar gelişme hızını etkiler ve uygun koşullar altında tam bir yaşam döngüsü sadece 8-12 haftadır (Firacative ve ark., 2020). Beyaz kubbe şeklindeki yumurtalar 28-34 °C'de yaklaşık 1-2 hafta içinde larvalara çıkar (Firacative ve ark., 2020). Kremsi renkli larvalar, koza gelişimine kadar 5-6 haftada 8-10 deri değıştirme aşamasından geçer (Firacative ve ark., 2020). 2-3 haftalık inkübasyondan sonra kırmızımsı kahverengi pupa soluk krem rengi bir güveye dönüşür (Firacative ve ark., 2020). Böceklerin doğuştan gelen bağışıklık sisteminin, onları geniş bir patojen yelpazesinden gelen enfeksiyonlara karşı koruduğı gösterilmiştir (Strand, 2008a). Genom araştırmaları, larvaların patojen tanıma ve sinyal iletimine katılan insanlarla birçok homolog gene sahip olduğunu göstermiştir (Mikulak ve ark., 2018). *G. mellonella*'da doğuştan gelen bağışıklık sistemi, kütikül, hücresel ve humoral bağışıklık savunmasından oluşur (Kavanagh ve Reeves, 2004). Kütikül, ilk koruma hattını temsil eder ve esas olarak kitin, lipid ve proteinden oluşur. Bu moleküllerin tümü, patojenlerin istilasını önlemek için fiziksel bir bariyer görevi görür (Kavanagh ve Reeves, 2004). Kütikula, epikütikula, prokütikula ve epidermis dahil olmak üzere üç dış katmanda organize edilmiştir (Singkum ve ark., 2019). Sağlam epidermis patojen girişini engeller, ancak hasar nedeniyle bozulduğunda, hücresel ve humoral bağışıklık savunmayı devralır. Hücresel bağışıklık sistemine, esas olarak kapsülleme, nodülasyon ve fagositozdan sorumlu olan hemosit adı verilen fagositik hücreler aracılık eder (Tojo ve ark., 2000; Tsai ve ark., 2016). Bugüne kadar, böceklerde bulunan sekiz tip hemositten altısının *G. mellonella*'daki (plazmatositler, granüositler, prohemositler, sferüositler, koagüositler ve önositoidler) bu işlevlerden sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Neuwirth, 1973; Pereira ve ark., 2020). İlk olarak, granüler hücreler nüfuz eden mikroorganizmalara saldırır, daha sonra işlem, bir hücre tabakası oluşturmak için plazmatositlerin bağlanmasını teşvik eder, bu da kapsülleme ve nodülasyon ile sonuçlanır. Fagositoz, hemositlerin katılımıyla insan hücresel savunma reaksiyonlarına benzer (Singkum ve ark., 2019). Humoral immün yanıt, melanizasyon, hemolenf pıhtılaşması ve birincil immünizasyonda rol oynayan kompleman benzeri proteinler (opsoninler), melanin ve AMP'ler gibi çözünür efektörler tarafından yüksek oranda düzenlenir (Pereira ve ark., 2018).

Son yıllarda, *G. mellonella* güçlü, güvenilir, hızlı ve ucuz bir konak-patojen enfeksiyon modeli etkinliğini incelemek için iyi bir alternatif konak olarak ortaya çıkmıştır ve memeli modellerinin yerini almasıyla, *G. mellonella* tahlilleri yoluyla toplanan ilk veriler, yeni ilaç geliştirme ve klinik uygulamalar için önemli bir referans sağlar (Lange ve ark., 2018). Ayrıca, yeni moleküler araçlarla ilişkili *G. mellonella* genom dizisi mevcudiyeti ile bu böcek modeli, gelecekteki biyomedikal araştırmalar için değerli olacaktır (Lange ve ark., 2018).

Tez çalışması kapsamında, polistiren temelli mikroplastiklerin model organizma *G. mellonella* hemosit aracılı bağışıklık sistemi üzerine etkileri belirlendi. Ayrıca, *G. mellonella* antioksidan enzim aktivitelerinde ve fenoloksidaz aktivitesinde meydana gelen değişikliklerde tespit edildi. Mikroplastığın karasal ve sucul canlılar üzerindeki olumsuz sonuçlar yaratan birçok önemli bulgu olduğu göz önüne alındığında, *G. mellonella* konak bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin belirlenmesinin günümüzün giderek büyüyen bir problemi olan plastik atıkların yol açtığı mikroplastiklerin canlı bünyesinde birikerek meydana getirdiği hasarın ortaya konulmasında ve ileride mikroplastığe bağlı hastalıkların kontrol uygulamalarında yarar sağlayacağı değerlendirilmektedir. Bu bakımdan, *G. mellonella* mikroplastik enjeksiyonunun konak hücresel bağışıklık sisteminin hemositler üzerine sitotoksik etkisini ortaya koyan bu çalışmanın, konak hücresel bağışıklığının ve enzim aktivitesi rolününün daha detaylı olarak anlaşılmasına yardım edeceği, ayrıca, elde edilen verilerin böcek biyokimyası, fizyolojisi, gelişim biyolojisi, biyolojik kontrol ve insan sağlığı ile ilgili çalışmalara da yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

2. MATERYAL VE METOT

Tez çalışmasında kullanılan büyük balmumu güvesi (*G. mellonella*) örnekleri Balıkesir Üniversitesi Böcek Fizyolojisi laboratuvarında 25 ± 2 °C ve 65 ± 5 bağıl nem koşulları altında yetiştirildi.

2.1 Deney örneklerinin yetiştirilmesi

Çalışmamızda kullanılan *G. mellonella* larvaları Balıkesir Üniversitesine bağlı Fen-Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji Bölümünde yer alan Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarında devam etmekte olan kültürden alınan erişkin örneklerden yetiştirilerek elde edilmiştir. Deney grupları için yetiştirilen koloniden elde edilen dört dişi ve iki erkek erişkin birey iki gr doğal kararmış petek içeren bir litrelik cam kavanoza yerleştirildi. Kavanozun ağzına hava sirkülasyonuna engel olmayacak dokuya sahip kumaş yerleştirilerek, üzeri delinmiş kavanoz kapağıyla kapatıldı. Bu kavanozlar belirtilen şartlardaki laboratuvar koşullarında bırakıldı. Deney için oluşturulan kavanozlarda ilk larvalar görüldüğünde ortama 10 gr yapay besiyeri ilave edildi (Bronskill, 1961). Uygun ağırlığa (0.18 ± 0.02 g) ulaşan son evre larvaları seçilerek çalışmada kullanıldı.

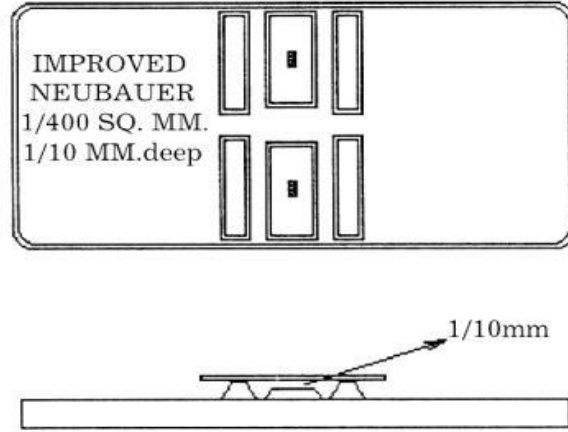
2.2 Dozların hazırlanması ve Enjeksiyon

Deney için polisitriken mikroplastik (Sigma, Almanya EK: A) su ile seyreltilerek kullanıldı. Çalışmamızda, *G. mellonella* larvaları üzerinde mikroplastik yükünün doğal bağışıklığına etkisini belirlemek için 1, 5, 20, 40 ve 80 mg/mL mikroplastik yükü dozlarımız olarak belirlendi. Deney için seçilen örneklerin abdominal proleglerinin son segmentinde sağ bacak içerisinden mikroenjektör (25 µl Hamilton, ABD) yardımıyla her bir bireye 5 µl olacak şekilde mikroplastik dozları enjekte edildi. Doz enjekte edilen larvalar enkapsülasyon-melanizasyon, hemosit sayımı, fenoloksidaz ve antioksidan enzim aktivitesi çalışmalarında kullanıldı. Enjeksiyon sonrası deneklerin vücudundan hemolenf sızmasının engellenmesi için enjeksiyon bölgelerine vazelin sürüldü.

2.3. Hemosit sayımı

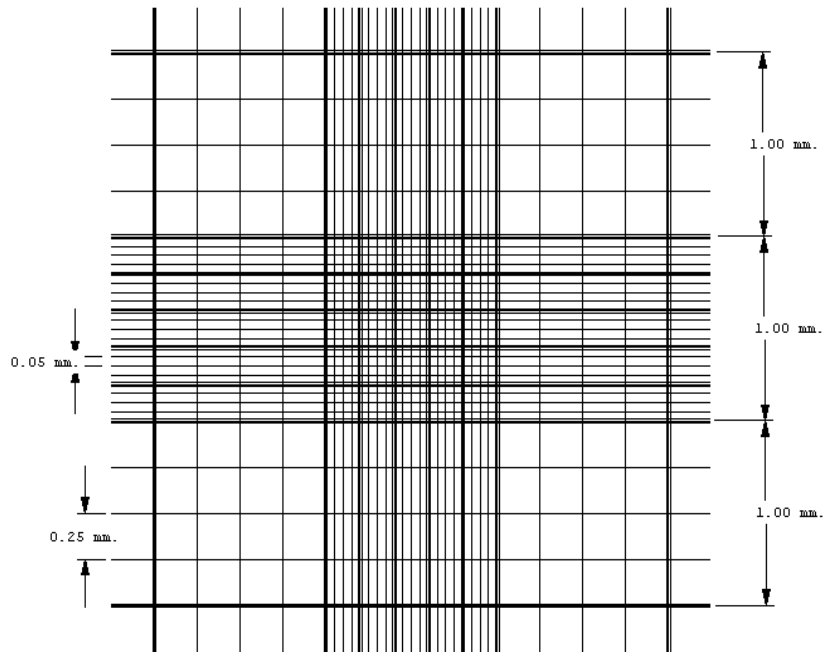
1-80 mg/mL doz aralığındaki mikroplastik *G. mellonella* larvalarına uygulanmıştır. Bu larvalardan toplanan hemolenflerdeki hemosit sayıları belirlendi. Belirtilen dozlar üç tekrarlı olacak şekilde beş larvaya uygulandı. Birinci abdominal prolegin ön segmentinden mikropipet ile alınan 4 µl hemolenf 36 µl antikuagulant içeren ependorflara alındı. 10 kat dilüe edilen

örnekler vortex aracılığıyla karıştırıldıktan sonra Neubauer hemositometre lamı ile Faz-Kontrast mikroskobunda sayıldı.



Şekil 2.1; Neubauer Hemositometre Lamı

Şekil 2.1’de görüldüğü üzere Neubauer lamında iki farklı sayım alanı mevcuttur. 16 tane orta büyüklükte kareye ayrılmış 1 mm^2 ’lik sayım alanı mevcuttur. Ortada ise etrafı çift çizgi ile çevrelenmiş 25 adet orta büyüklükte kare bulunmaktadır. Lamın üzerindeki orta ve küçük büyüklükteki alanların hacim kapasitesi hesaplanabilmektedir. Bu durumda hemositometre üzerinde kare başına düşen hemosit sayıları sayılarak toplam hemosit sayısı tahmin edilebilir (Şekil 2.2). Buna göre; mL başına düşen hücre sayısı; büyük karede sayılan hücre sayısı ve sulandırma katsayısının 10,000 katıdır.



Şekil 2.2; Neubauer hemositometresi sayım alanı

2.3 Enkapsülasyon- Melanizasyon

Çalışmamızın enkapsülasyon-melanizasyon deneyleri daha önceden gerçekleştirilen çalışmalar referans alınarak gerçekleştirilmiştir (Er ve ark., 2011; Altuntaş ve ark., 2012; Kaya ve ark., 2021). Buna göre uygun boyuttaki larvalara enjekte edilen enkapsülasyon ajanı belirli süreler sonunda toplanarak fast-kontrast mikroskop yöntemiyle değerlendirildi.

Literatürdeki yöntemlere göre; Sephadex DEAE A-25 (40-120 µm) kromatografi boncukları hücresel bağışıklığın göstergesi olan enkapsülasyon ve melanizasyon tepkimelerini belirlemek için kullanıldı. %1'lik Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası ile görünür haline getirilen boncuklar 50 µl kapasiteli ve 22 g uçlu cam mikroenjektör (Hamilton, ABD) yardımıyla örneklerle enjekte edildi. Deney grupları enjeksiyon sonrası 4 ve 24 saat olacak şekilde iki ana gruba ayrılmıştır. Her deney grubu için yapılan bu işlemde stereomikroskop altında 40X büyütmede larvaların tüm vücut bölgelerinde boncuklar toplanarak fosfat tampon çözeltisi (PBS) içeren lam üzerine alınmıştır. Toplanan boncuklar Richards ve Dani (2008)' nin çalışmasında belirtmiş olduğu kriterlere göre değerlendirilmiştir. Bu kriterler;

- Olmamış: boncuk etrafında enkapsülasyon yok ya da sadece birkaç hemosit var.
- Zayıf: Boncuk etrafında 2 ila 8 katmanlı hemosit kapsülü var.
- Güçlü: Boncuk etrafında 10'dan fazla hemosit katmanı ile kapsül oluşmuş.

Değerlendirme yapılırken Kaya (2015)'da belirtildiği üzere hücre katmanlarının boncuğun çevresinin en az %50'sinde mevcut olması gerektiği dikkate alınmıştır.

Melanizasyon değerlendirilirken Kaya ve ark. (2021) makalesindeki yöntem esas alındı. Buna göre enkapsülasyon sayımlarındaki hücrelerin melanize olması değerlendirilmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde olmamış, zayıf, orta ve güçlü tepkileri sırasıyla; melanizasyon görülmeyen, %0-20 arası melanizasyon az, %20-70 arası melanizasyon orta ve %70 ila üstü güçlü melanizasyon olarak değerlendirmeye alındı.

2.4 Antioksidan Aktivite Ölçümleri

Çalışma kapsamında dört farklı zaman diliminde birbirinden bağımsız olacak şekilde kontrol ve uygulama gruplarına ait 16 larvadan hemolenf örneği ile çalışıldı. Tüm enzimatik aktivite tayinleri 96 kuyucuklu mikrolaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Finlandiya) cihazı ile gerçekleştirildi.

2.4.1 Total Protein (TP) Tayini

Proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasına bağlanması sonucunda meydana gelen renkli çözeltilerin 595 nm’de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır. Çalışmada TP tayini Bradford (1976) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ependorf içerisinde bulunan hemolenf- fosfat tampon içeriğinin santrifüj aracılığıyla çökmesi sağlandı ve her bir ependorf üzerinden süpernatant alınıp mikrolakanın kuyucuklarına 5 µl eklendi. Eklenen örneklerin üzerine 155 µl distile su ve 40 µl Bradford reaktifi eklendi. Reaktifin proteinler ile etkileşim haline geçebilmesi için oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi (Tablo 2.1). 15 dk. sonunda mikrolaka okuyucu da 595 nm’de absorbanslar kaydedildi. Protein miktarı standart grafiği yardımı ile hesaplandı ve sonuçlar mg protein mg/mL olarak belirlendi.

Tablo 2.1; Protein tayini standart stok çözeltilerinin hazırlanması.

	Kör	St1	St2	St3	St4	St5	Örnek
Albumin							
(%10mg)	–	4µl	8 µl	12 µl	16 µl	20 µl	–
Distile su	160 µl	156 µl	152 µl	148 µl	144 µl	140 µl	155 µl
Doku							5µl
Homojenatı	–	–	–	–	–	–	
Bradford							
Reaktifi	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl

2.4.2 Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini

Nitro Blue Tetrazolium (NBT) maddesinin süperoksit radikalleri tarafından indirgenmesiyle ölçülen bir yöntemdir. Hipoksantin/ksantin tarafından üretilen O² radikali NBT’yi indirgediğinde mavi renkli formazon maddesi 550 nm de maksimum absorbans verir (Çiğremiş, 1997). Çalışma Flöhe ve Ötting (1984) metoduna göre yapıldı.

Hemolenf-fosfat tampon karışımından 6,5 µl süpernatant alınarak mikroplakaya eklendi ve üzerine 3,5 µl ksantin oksidaz eklendi. Mikroplakanın örnek eklenen her bir kuyucuğuna 190 µl SOD reaktifi eklenerek 25 °C’de 20 dakika ışıktta inkübe edildi ve üzerine 6,5 µl CuCl₂ (0,8 mM) çözeltisi eklendi (Tablo 2.2). Çalışmanın en son aşaması olarak hazırlanan mikroplaka 560 nm absorban ile ölçüldü ve SOD aktivitesi tespit edildi. Elde edilen sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edilecek şekilde hesaplandı.

Tablo 2.2; SOD enziminin tayini için gerekli çözeltiler.

Çözeltiler	Kör	Örnek
SOD Reaktifi	190 µl	190 µl
Süpernatant	–	6,5 µl
Ksantin Oksidaz Çöz. (167 U/L)	3,5 µl	3,5µl
CuCl ₂ Çözeltisi (0,8 mM)	6,5 µl	6,5 µl

2.4.3 Katalaz Aktivitesi (CAT) Tayini

H₂O₂’nin H₂O’ya dönüşümünü sağlayan en önemli enzimlerden biri de katalazdır. Kinetik olarak 240 nm de ölçülen bu enzim bir dakikalık absorbanstaki azalma aktivitesine bakarak tayin edilir. Çalışma; Aebi (1984) metodu kullanılarak gerçekleştirildi.

Hemolenf-fosfat tampon karışımından 6,5 µl süpernatant alındı ve mikroplaka kuyucuklarına eklendi. Eklenen örneklerin üzerine 60 µl fosfat tamponu (50 mM, pH=7,2) ve 133,5 µl H₂O₂ (30 mM) ilave edilerek 10 saniyelik aralıklarla iki dakika boyunca 240 nm absorbansta kinetik ölçümler alındı. Sonuçlar U/mg protein dk olarak belirlendi.

Tablo 2.3; CAT enzimi tayini için gerekli çözeltiler.

Çözeltiler	Örnek	Kör
Fosfat Tamponu	60 µl	65 µl
H ₂ O ₂ Çözeltisi	133,5 µl	133,5 µl
Süpernatant	6,5 µl	–

2.4.4 Lipid Peroksidaz (LPO) Düzeyi

Ortama eklenen tiyobarbitürik asit (TBA), homojenatın içerisinde bulunan malondialdehit (MDA) ile 95-100 °C sıcaklıkta birleştiğinde pembe renge dönüşür. Lipit peroksidazın en önemli göstergelerinden biri olan MDA oluşturulan TBA-MDA kompleksinin verdiği absorbans ile 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Camejo ve ark., 1998). Çalışma, Buege ve Aust (1978) yöntemine göre gerçekleştirildi. Hemolenf- fosfat tampon karışımından 75 µL süpernatant alındı ve mikropalakaya eklendi. Mikroplaka kuyucuklarına eklenen örneklerin üzerine 150 µL tiyobarbitürik asit ve trikloroasetik asit ile hazırlanan çözelti eklendi (Tablo 2.4) ve mikropalakalar 20 dk 95 °C’de inkübe edildi. İnkübatörden çıkartılan örnekler oda sıcaklığında soğutuldu ve 532 nm absorbans ile ölçüm yapılarak değerler kaydedildi.

Tablo 2.4; MDA miktarı tayini için gerekli çözeltiler.

Çözeltiler	Kör	Örnek
KCl Çözeltisi (150 mM)	50 µL	–
TBA Çözeltisi	100 µL	100 µL
Süpernatant	–	50 µL

2.4.5 Fenoloksidaz Aktivite Tayini

Çalışmada Kaya (2020)’nın yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre deneklerden toplanan süpernatantlardan 40 µl alınarak mikropalakada her bir kuyucuğa yerleştirildi. Sonrasında her bir kuyucuğa fosfat tampon çözeltisinde 3 mg/mL oranında çözündürülerek hazırlanan 3,4-Dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA-Sigma-Aldrich, St Louis, MO)’den 160 µl eklendi. Mikroplaka; 30 dakikalık bir süre zarfında beşer dakika ara ile toplamda yedi kez 492 nm’de absorbanstaki aktivite değişimi, mikropalaka okuyucu (ThermoFisher Multiscan FC, ABD) ile okunarak sonuçlar TP ile oranlanarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

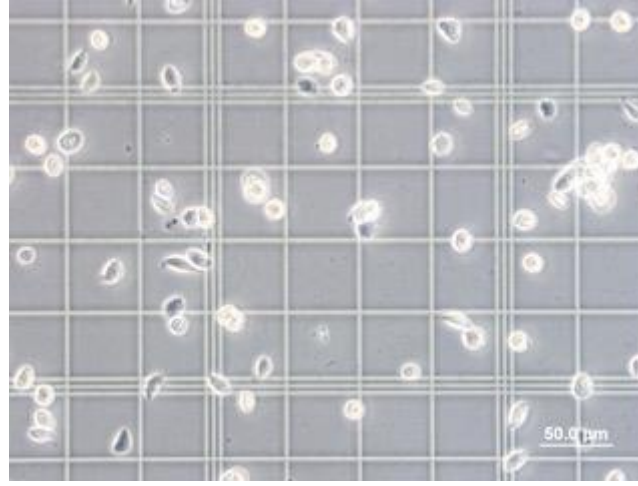
2.5 İstatistik

Verilerin girilmesi ve değerlendirilmesi IBM SPSS Statistics 21.0 programı ile yapılmıştır. Tüm deney sonuçlarında tek yönlü varyans analizleri (ANOVA) kullanılmış olup Post-Hoc test olarak ise Tukey HSD kullanılmıştır. Sonuçlar P < 0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

3. BULGULAR

3.1 *G. mellonella* ' da Toplam Hemosit Sayısı

Mikroplastik enjeksiyonlu dozlardaki hemosit ortalamaları birbirine yakın değerlerdedir ve gruplar arasında fark yoktur. Kontrol grupları ile mikroplastik enjeksiyonlu gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir (Tablo 3.1; Şekil 3.2). Bu değişim şekil 3.2'de ayrıca gösterilmiştir. En yüksek THS kontrol grubunda görülmüştür (226,31). En düşük THS ise 20 mg/mL dozunda (162,75) belirlenmiştir. Mikroplastik enjeksiyon grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır. Kontrol ve uygulama dozlarına ait hücre sayıları tabloda verilmiştir (Tablo 3.1; Şekil 3.2).



Şekil 3.1; Neubauer lamında hücre genel görüntüsü

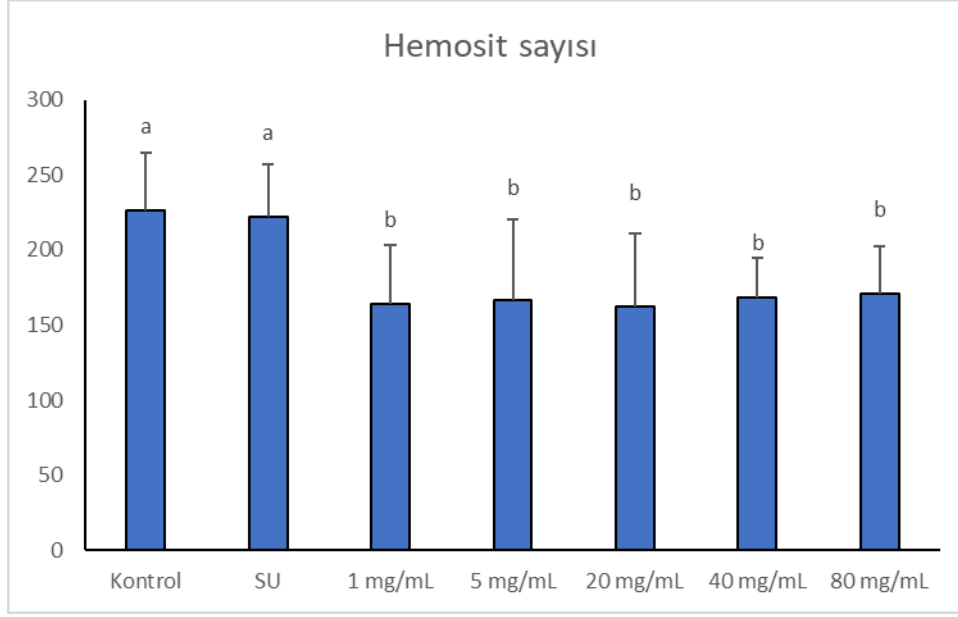
Tablo 3.1; Toplam hemosit sayısı.

Dozlar	Kontrol	dH ₂ O	1 mg/mL	5 mg/ mL	20 mg/mL	40 mg/mL	80 mg/mL
Hücre Sayısı	226,31 ±38,48 ^a	222,33 ±35,07 ^a	163,81 ±39,24 ^b	166,25 ±53,76 ^b	162,75 ±48,40 ^b	168,13 ±26,34 ^b	171,19 ±30,93 ^b

* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

** Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (P>0,05, Tukey HSD Testi).

*** F=8,116; sd=6, 105; P= 0,00



Şekil 3.2; Mikroplastik enjeksiyonu sonucu *G. mellonella* hemolenfinde toplam hemosit sayısı

3.1.1 Mikroplastığın enkapsülasyona etkisi

Belirlenen mikroplastik dozları enjekte edilen *G. mellonella* larvalarındaki enkapsülasyon tepkisindeki farklılıkları incelemek için üç tekrar yapıldı ve tepkiler 4. saat ile 24. saatte gözlemlendi. Dördüncü saat için elde edilen sonuçlar Şekil 3.3’de, 24. saat için elde edilen sonuçlar Şekil 3.4’de gösterilmektedir. Ayrıca elde edilen verilerin tamamı Tablo 3.2’de sunulmaktadır. Yapılan tek yönlü varyans analizi sonucuna göre mikroplastik dozları kontrol grubuna göre değişiklikler gösterse de bu farklılıklar 4. saatte istatistiki olarak anlamsız bulunurken, 24. saatte 20, 40 ve 80 mg/mL arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Bu dozların diğer dozlar ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde 4. saatte olmamış enkapsülasyon grupları arasında fark görülmemiştir. Zayıf dereceli enkapsülasyon da gruplar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Güçlü enkapsülasyon bakımından değerlendirildiğinde 20 ve 40 mg/mL dozları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yoktur. Mikroplastik enjeksiyon grupları arasında enkapsüle olmamış, zayıf ve güçlü boncuklar bakımından değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Olmamış enkapsülasyon grubunda en yüksek değer 40 mg/mL de (30,57); en düşük değer ise kontrol grubunda (13,39) gözlemlenmiştir. Zayıf enkapsülasyon grubunda en yüksek değer dH₂O grubunda (79,96); en düşük değer ise 40 mg/mL de (62,95)

gözlemlenmiştir. Güçlü enkapsülasyonda en yüksek değer kontrol grubunda (17,16); en düşük değer ise 40 mg/mL grubunda (6,47) gözlemlenmiştir (Tablo 3.2).

24. saatte olmamış enkapsülasyon grubunda kontrol grubuna göre 1 ve 5 mg/mL arasında fark vardır. Bu grupta en yüksek değer 1 mg/mL de (26,80); en düşük değer ise dH₂O grubunda (2,59) görülmüştür. Zayıf enkapsülasyon grubunda kontrol grubuna göre 20, 40 ve 80 mg/mL gruplarında fark görülmüştür. Bu grupta en yüksek değer 40 mg/mL de (94,73); en düşük değer kontrol grubunda (54,87) gözlemlenmiştir. Güçlü enkapsülasyon grubunda kontrol grubuna göre bütün enjeksiyon gruplarında önemli bir azalma gözlemlenmiştir. Bu grupta ise en yüksek değer kontrol grubunda (42,49); en düşük değer 20 mg/mL (4,31) de gözlemlenmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2; Mikroplastığın *G. mellonella* enkapsülasyonuna etkisinin 4. saat ve 24. saat sonuçları.

4 saat (ortalama ± SH*)				
Mikro plastik	Boncuk Sayısı	Enkapsüle olmamış	Zayıf Enkapsülasyon	Güçlü Enkapsülasyon
Kontrol	226	% 13,39 ±15,75 ^a	% 65,43 ± 20,35 ^a	% 21,17 ± 19,98 ^a
dH₂O	206	% 8,89 ±11,74 ^a	%78,61± 12,71 ^a	% 12,48 ± 10,14 ^a
1 mg/mL	246	%23,47 ± 21,61 ^a	%66,45 ± 21,34 ^a	%10,07 ± 10,79 ^a
5 mg/mL	264	% 22,43 ±27,89 ^a	% 67,62 ± 28,09 ^a	% 9,94 ± 7,10 ^a
20 mg/mL	304	% 26,78 ±20,73 ^a	%65,52 ± 22,41 ^a	% 7,68 ± 8,40 ^a
40 mg/mL	251	% 30,57 ±20,34 ^a	% 62,95 ± 19,47 ^a	% 6,47 ± 9,29 ^a
80 mg/mL	260	% 15,10 ±19,09 ^a	% 69,96 ± 20,17 ^a	% 14,92 ± 13,22 ^a

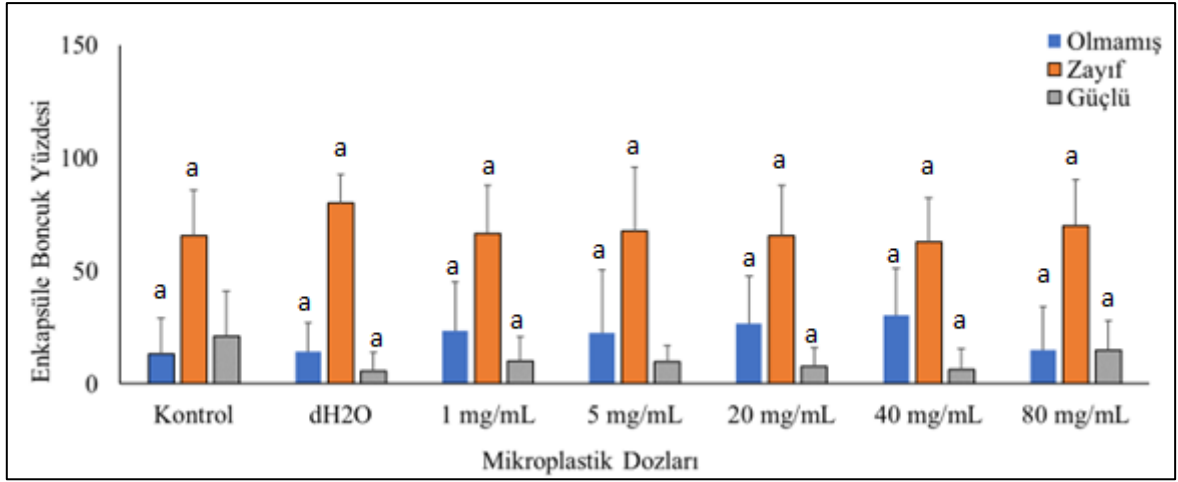
24 saat (ortalama ± SH*)				
Mikro plastik	Boncuk Sayısı	Enkapsüle olmamış	Zayıf Enkapsülasyon	Güçlü Enkapsülasyon
Kontrol	300	% 2.63 ± 3,91 ^a	% 54,87 ± 14,35 ^a	% 42,49 ±15,62 ^a
dH₂O	227	%2,59 ± 3,78 ^a	%72,23 ± 10,73 ^{ab}	% 33,78 ±13,46 ^a
1 mg/mL	73	% 26,80 ± 18,99 ^b	% 67,09 ± 20,19 ^{ab}	% 6,10 ± 8,95 ^b
5 mg/mL	63	% 25,04 ± 21,13 ^b	% 69,61 ± 20,87 ^{ab}	% 5,34 ± 6,41 ^b
20 mg/mL	286	%18,20 ± 17,18 ^{ab}	% 77,48 ± 15,87 ^b	% 4,31± 5,43 ^b
40 mg/mL	302	%15,76 ± 14,95 ^{ab}	% 94,73 ± 15,93 ^b	% 4,32 ± 10,31 ^b
80 mg/mL	269	% 11,93 ± 17,85 ^{ab}	% 80,63 ± 18,95 ^b	% 7,42 ± 9,51 ^b

* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

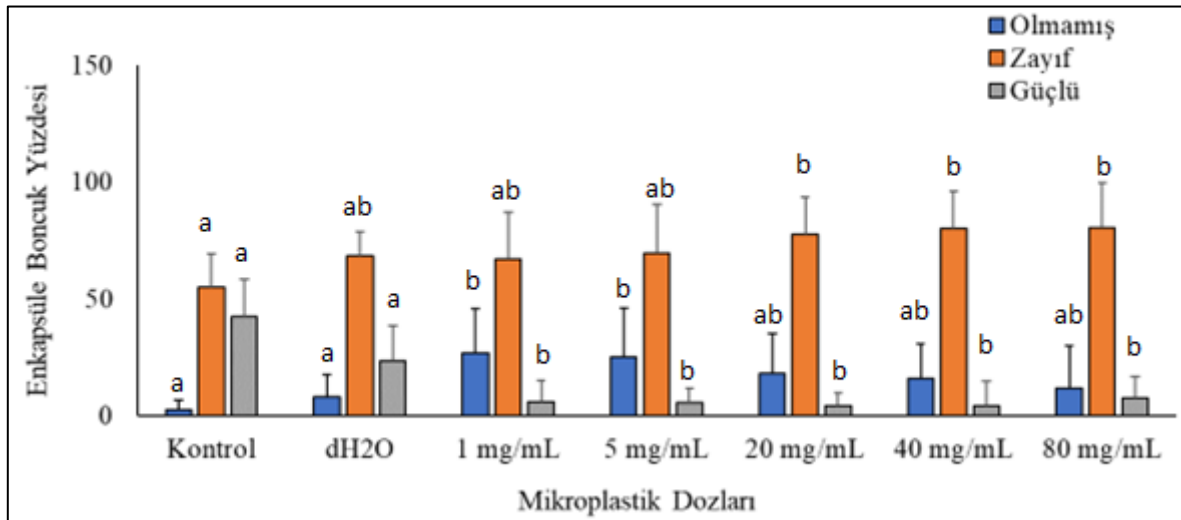
** Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (P>0,05, Tukey HSD Testi).

*** 4 saat olmamış: F=1,707; sd=6, 105; P= 0,127; zayıf: F=0,778; sd=6, 105; P= 0,589; güçlü: F=3,549; sd=6, 105; P= 0,003

**** 24 saat olmamış: F=4,773; sd=6, 105; P= 0,000; zayıf: F=4,230; sd=6, 105; P= 0,001; güçlü: F=28,089; sd=6, 105; P= 0,000



Şekil 3.3; Mikroplastığın *G. mellonella* enkapsülasyonuna etkilerinin 4. saat sonuçları



Şekil 3.4; Mikroplastığın *G. mellonella* enkapsülasyonuna etkilerinin 24. saat sonuçları

3.1.2 Mikroplastığın Melanizasyona Etkisi

Farklı dozlardaki mikroplastığın konak *G. mellonella* hemositlerinin melanizasyona etkisinin incelendiği deneylerde 4. saat sonucunda ulaşılan sonuçlar Şekil 3.5'te gösterilmektedir. Şekil 3.6'da ise 24. saat sonuçları verilmektedir. Tüm sonuçlar bir arada Tablo 3.3'te gösterilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde 4. saatte zayıf melanizasyon grupları arasında fark görülmemiştir. Orta dereceli melanizasyonda da gruplar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Güçlü melanizasyon bakımından değerlendirildiğinde 5, 40 ve 80 mg/mL dozları ile kontrol grubu

arasında anlamlı bir fark vardır. Bunun yanında kontrol grubu ile dH₂O, 1 ve 20 mg/mL dozları arasında önemli bir farklılık bulunmamaktadır. Ancak dH₂O ile 5, 40 ve 80 mg/mL arasında ise fark yoktur. Mikroplastik enjeksiyon grupları arasında melanize olmamış, zayıf, orta ve güçlü boncuklar bakımından değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Olmamış melanizasyon grubunda en yüksek değer 40 mg/mL de (97,32); en düşük değer ise dH₂O grubunda (87,56) gözlemlenmiştir. Zayıf melanizasyon grubunda en yüksek değer dH₂O grubunda (8,46); en düşük değer ise 1 mg/mL de (2,45) görülmüştür. Orta melanizasyonda en yüksek değer 20 mg/mL de (3,23); en düşük değer ise kontrol ve 40 mg/mL de (0) görülmüştür. Güçlü melanizasyonda en yüksek değer kontrol grubunda (2,79); en düşük değer ise 5, 40 ve 80 mg/mL de (0) gözlenmiştir. 24. saatte olmamış melanizasyon grubunda kontrol grubuna göre 1, 5, 20 ve 40 mg/mL arasında fark vardır. Bu grupta en yüksek değer 40 mg/mL de (93,09); en düşük değer ise 20 mg/mL grubunda (93,41) görülmüştür. Zayıf melanizasyon grubunda kontrol grubu ve 40 mg/mL gruplarında fark görülmüştür. Bu grupta en yüksek değer kontrol grubunda (12,25); en düşük değer 40 mg/mL de (2,99) gözlemlenmiştir. Orta melanizasyon grubunda kontrol grubuna göre 20 ve 80 mg/mL gruplarında fark vardır. Bu grupta en yüksek değer 80 mg/mL (7,72) de; en düşük değer kontrol grubunda (0) görülmüştür. Güçlü melanizasyon grubunda kontrol grubuna göre 1, 5, 20 ve 40 mg/mL gruplarında fark gözlemlenmiştir. Bu grupta ise en yüksek değer kontrol grubunda (19,38); en düşük değer 5 mg/mL (0,77) de gözlenmiştir.

Tablo 3.3; Mikroplastığın *G. mellonella* melanizasyonuna etkisinin 4. ve 24. saat sonuçları.

4. Saat Melanizasyon (% ± SH*)				
Mikroplastik	Olmamış	Zayıf	Orta	Güçlü
Kontrol	93,56 ± 10,01 ^a	3,64 ± 6,53 ^a	0 ± 0 ^a	2,79 ± 5,69 ^a
dH₂O	94,80 ± 6,32 ^a	2,69 ± 4,24 ^a	0,44 ± 1,78 ^a	2,04 ± 3,88 ^a
1 mg/mL	96,39 ± 7,07 ^a	2,45 ± 5,36 ^a	0,72 ± 2,01 ^a	0,41 ± 1,66 ^a
5 mg/mL	94,91 ± 10,26 ^a	4,02 ± 8,59 ^a	1,06 ± 2,30 ^a	0 ± 0 ^a
20 mg/mL	93,41 ± 8,96 ^a	2,92 ± 5,50 ^a	3,23 ± 6,67 ^a	0,41 ± 1,66 ^a
40 mg/mL	97,32 ± 4,54 ^a	2,67 ± 4,54 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
80 mg/mL	94,42 ± 4,24 ^a	4,27 ± 4,32 ^a	1,30 ± 2,77 ^a	0 ± 0 ^a

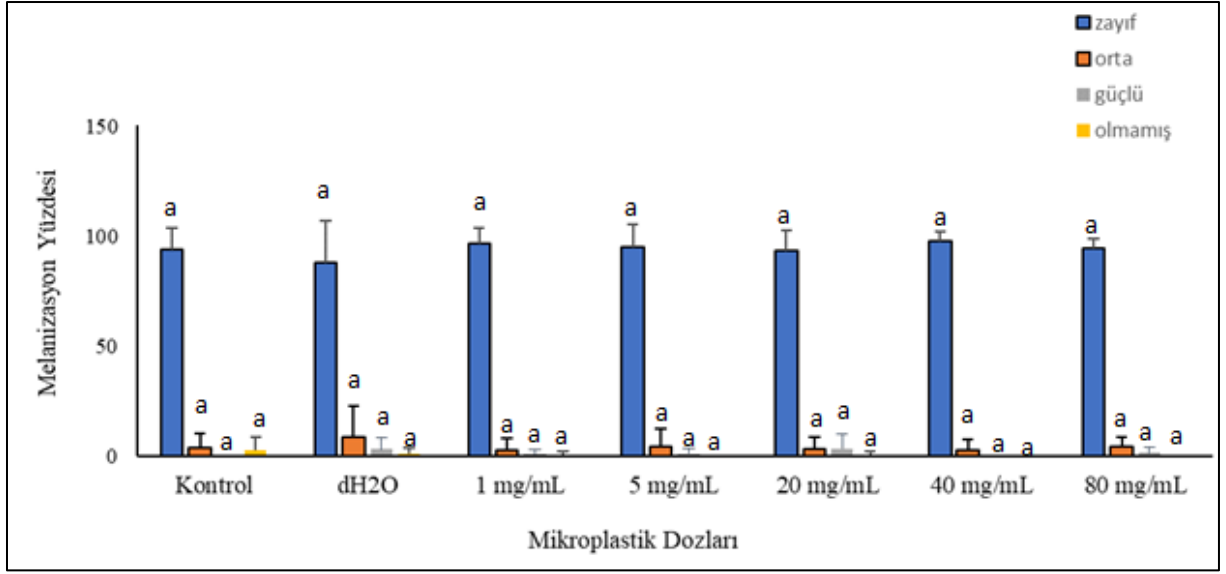
24. Saat Melanizasyon (% ± SH*)				
Mikroplastik	Olmamış	Zayıf	Orta	Güçlü
Kontrol	68,3 ± 14,85 ^a	12,25 ± 8,65 ^a	0 ± 0 ^a	19,38 ± 11,74 ^a
dH₂O	74,94 ± 7,13 ^{ab}	7,02 ± 5,01 ^{ab}	0,61 ± 1,74 ^{ab}	17,42 ± 8,79 ^a
1 mg/mL	89,32 ± 13,49 ^c	5,68 ± 8,47 ^{ab}	2,87 ± 4,91 ^{abc}	2,11 ± 4,72 ^b
5 mg/mL	90,58 ± 11,6 ^c	5,94 ± 7,65 ^{ab}	2,69 ± 4,28 ^{abc}	0,77 ± 2,19 ^b
20 mg/mL	84,35 ± 17,19 ^{bc}	8,27 ± 10,27 ^{ab}	6,07 ± 8,83 ^{bc}	1,29 ± 2,37 ^b
40 mg/mL	93,09 ± 6,76 ^c	2,99 ± 5,78 ^b	1,13 ± 2,05 ^{ab}	2,76 ± 4,47 ^b
80 mg/mL	75,13 ± 16,47 ^{ab}	11,07 ± 7,33 ^{ab}	7,72 ± 8,15 ^c	6,06 ± 6,69 ^b

* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

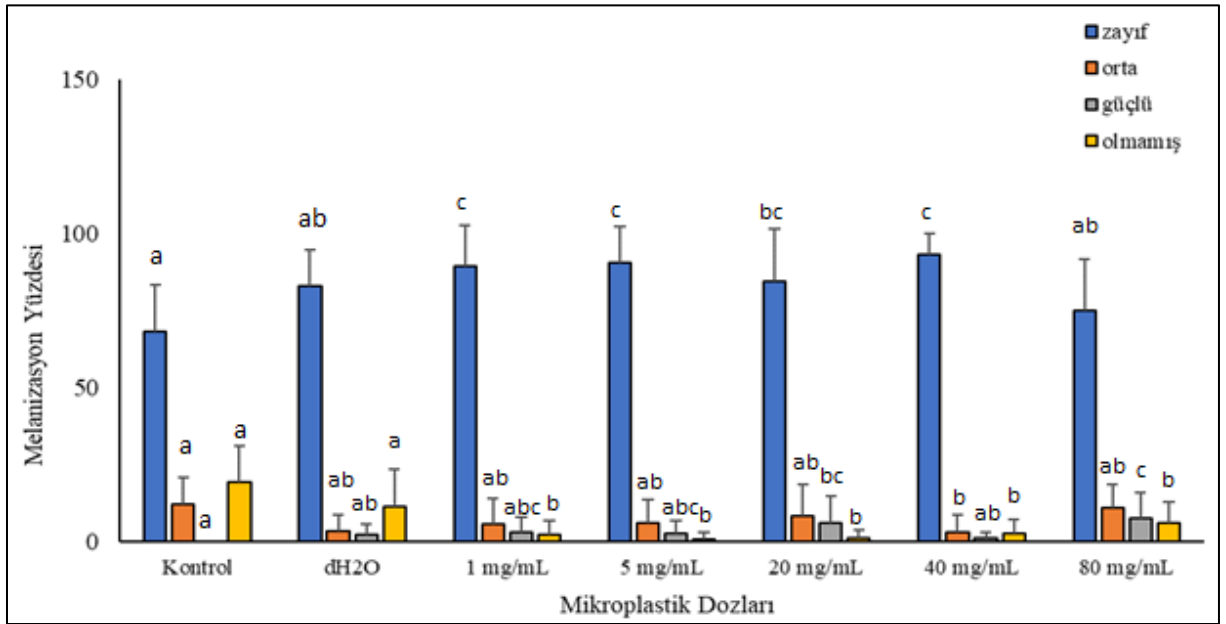
** Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (P>0,05, Tukey HSD Testi).

*** 4 saat olmamış: F=1,148; sd= 6, 104; P= 0,340; zayıf: F= 1,134; sd= 6,104; P= 0,348; orta: F= 2,083; sd= 6,104; P= 0,061; güçlü: F= 2,464; sd= 6,104; P= 0,029

**** 24 saat olmamış: F=6,004; sd=6,104; P= 0,000; zayıf: F=3,288; sd=6, 104; P= 0,005; orta: F=4,017; sd=6, 104; P= 0,001; güçlü: F=13,665; sd=6, 104; P= 0,000



Şekil 3.5; Mikroplastığın *G. mellonella* 4. saat melanizasyonuna etkisi (% değer)

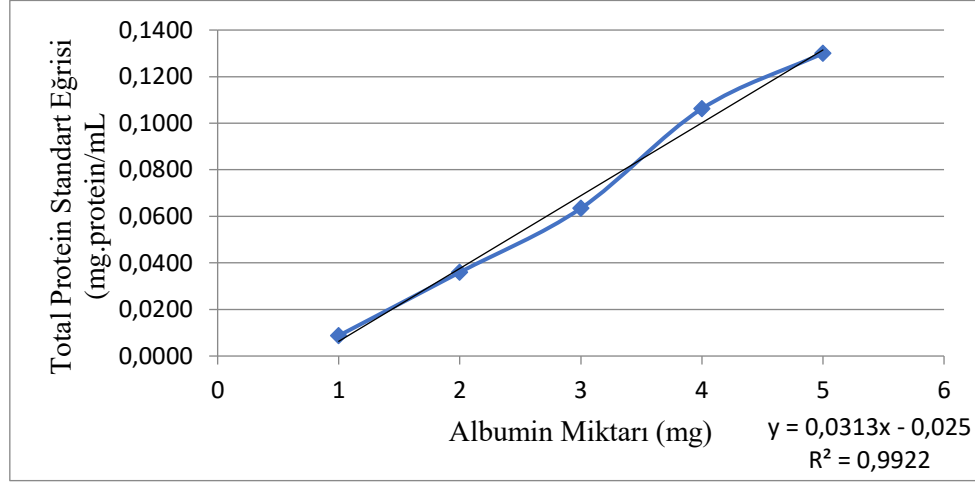


Şekil 3.6; Mikroplastığın *G. mellonella* 24. saat melanizasyonuna etkisi (% değer)

3.2 Mikroplastığın Antioksidan Savunma Mekanizması Üzerine Etkisi

3.2.1 Total Protein Miktarındaki Değişimler

G. mellonella dokularından total miktarını belirleyebilmek için öncelikle literatürde sıkça standart olarak kullanılan albumin çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak standart grafiği hazırlanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 2.7; Albumin ile hazırlanan protein standart grafiği

Konsantrasyonları önceden belirlenmiş olan çözeltilerin spektrofotometrik okumadaki absorbans karşılıkları aracılığıyla çizilen standart eğride regresyon katsayısı $y = 0,0313x - 0,025$ çalışma güven aralığı ise $R^2 = 0,9922$ olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.4; Mikroplastığın *G. mellonella*'da total proteine etkisi.

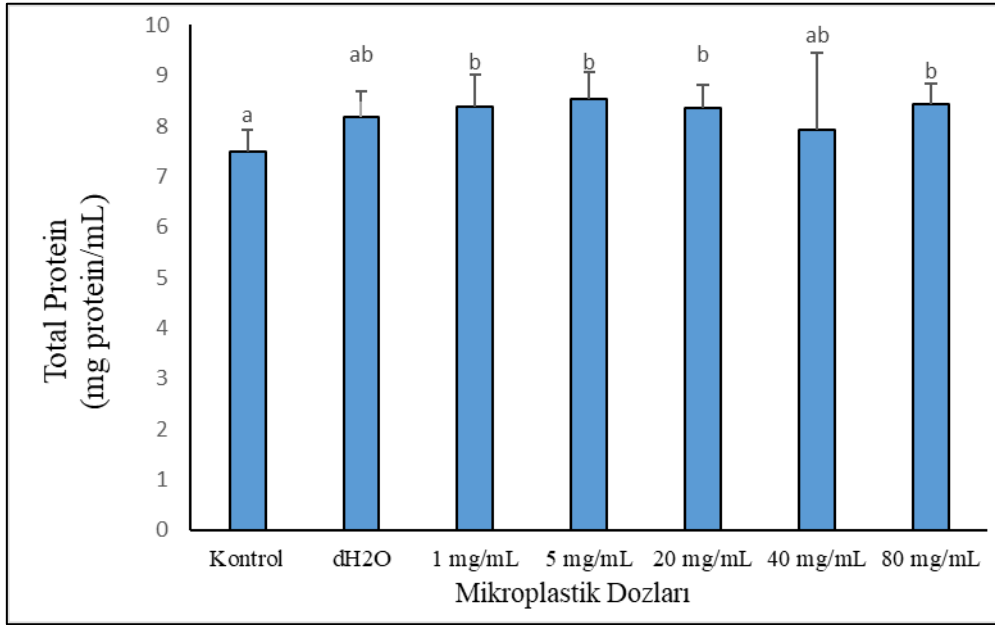
Dozlar	Kontrol	dH ₂ O	1 mg/mL	5 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL	80 mg/mL
Total Protein Miktarı (mg.protein/mL)	7,50 ±0,44 ^a	8,19 ±0,49 ^{ab}	8,39 ±0,63 ^b	8,54 ±0,52 ^b	8,37 ±0,46 ^b	7,92 ±1,53 ^{ab}	8,43 ±0,42 ^b

* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

** Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ($P > 0,05$, Tukey HSD Testi).

*** $F = 3,879$; $sd = 6, 105$; $P = 0,002$

Tüm gruplardaki bireylerin her biri için total protein miktarı standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır. Dozlar arası protein miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Tablo 3.4; Şekil 3.7). TP miktarı en yüksek 5 mg/mL (8,54) de; en düşük kontrol grubunda (7,50) görülmüştür. Çalışmanın sonuçlarına göre kontrol ile tüm enjeksiyon dozları arasında anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$). Mikroplastik enjeksiyonu *G. mellonella* hemolenfinde total protein miktarında artışa neden olmuştur.



Şekil 3.8; Mikroplastik enjeksiyonu sonucu *G. mellonella* hemolenfinde total protein miktarı

3.2.2 Superoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesindeki Değişimler

SOD aktivitesi unit/mg.protein cinsinden ifade edilecek şekilde hesaplanmış olup Tablo 3.5 ve Şekil 3.9'da verilmiştir. SOD miktarı en yüksek dH₂O grubunda (0,050); en düşük 5 mg/mL de (0,0044) gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

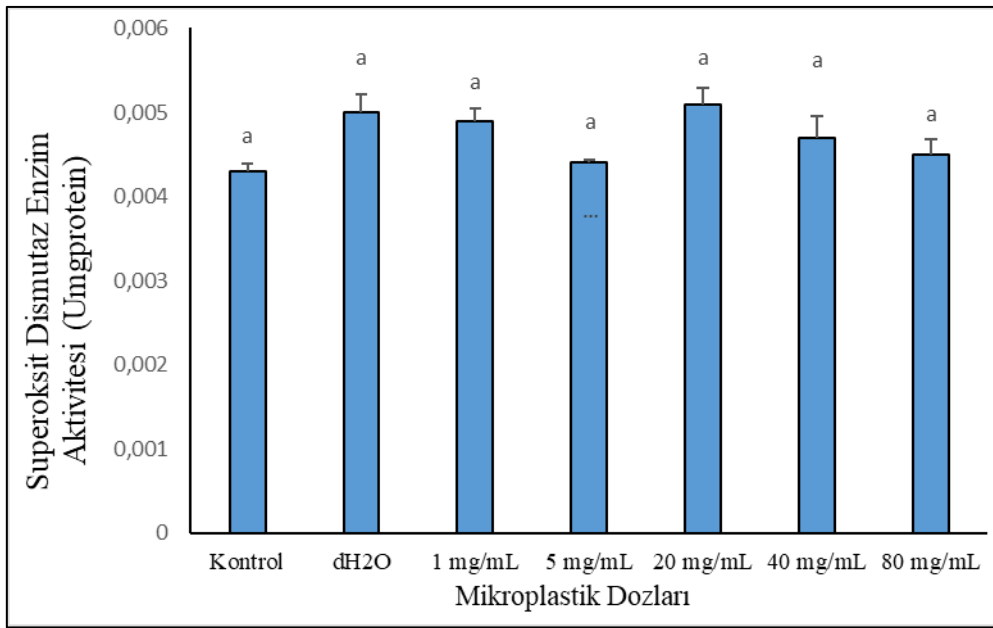
Tablo 3.5; Mikroplastığın *G. mellonella*'da SOD aktivitesine etkisi.

Dozlar	Kontrol	dH ₂ O	1 g/mL	5 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL	80 mg/mL
SOD (U/mg.protein)	0,0043 ±0,0009 ^a	0,0050 ±0,0021 ^a	0,0049 ±0,0014 ^a	0,0044 ±0,0004 ^a	0,0051 ±0,0019 ^a	0,0047 ±0,0026 ^a	0,0045 ±0,0018 ^a

* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

** Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (P>0,05, Tukey HSD Testi).

*** F=0,482; sd=6, 105; P= 0,820



Şekil 4.9; Mikroplastik enjeksiyonu sonucu *G. mellonella* hemolenfinde superoksit dismutaz enzim aktivitesi

3.2.3 Katalaz Enzim (CAT) Aktivitesindeki Değişimler

CAT aktivitesi unit/mg.protein/min cinsinden ifade edilecek şekilde hesaplanmış olup Tablo 3.6 ve Şekil 3.10'da verilmiştir. Değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. CAT miktarı en yüksek 80 mg/mL de (0,00059); en düşük 20 mg/mL de (0,00034) görülmüştür.

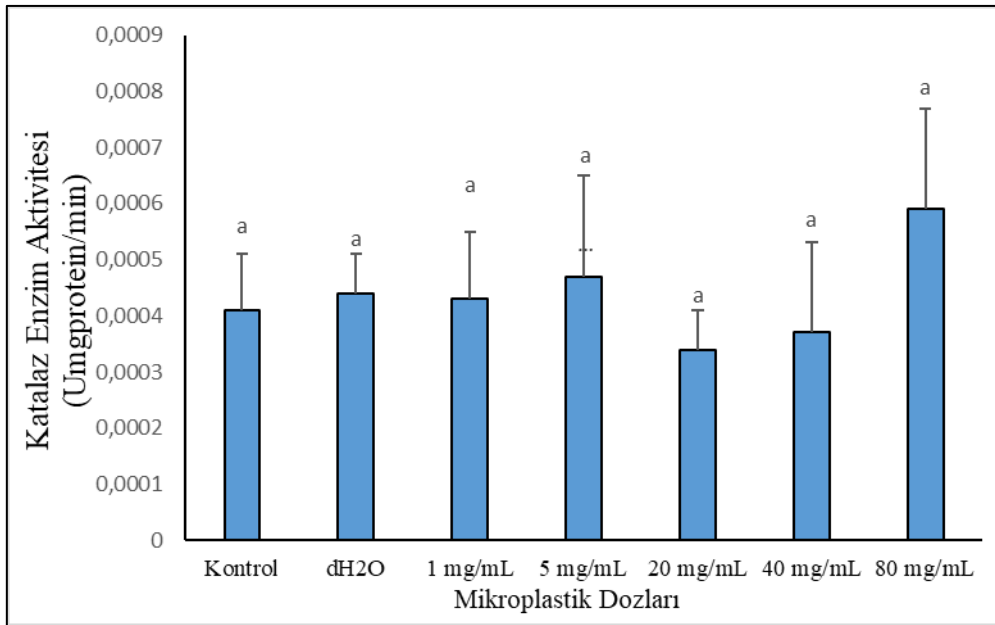
Tablo 3.6; Mikroplastığın *G. mellonella*'da CAT aktivitesine etkisi.

Dozlar	Kontrol	dH ₂ O	1 mg/mL	5 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL	80 mg/mL
CAT (U/mg.protein/min)	0,00041 ±0,0001 ^a	0,00044 ±0,00007 ^a	0,00043 ±0,00012 ^a	0,00047 ±0,00018 ^a	0,00034 ±0,00007 ^a	0,00037 ±0,00016 ^a	0,00059 ±0,00018 ^a

* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

** Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (P>0,05, Tukey HSD Testi).

*** F=2,138; sd=6, 105; P= 0,055



Şekil 5.10; Mikroplastik enjeksiyonu sonucu *G. mellonella* hemolenfinde katalaz enzim aktivitesi

3.2.4 Lipit Peroksidaz (LPO) Aktivitesindeki Değişimler

LPO miktarı kararlı yapıdaki malondialdehit (MDA) miktarı tayini ile hesaplanmıştır. Sonuçlar U/mg.protein cinsinden hesaplanmış olup tablo 3.7 ve şekil 3.11’de verilmiştir.

Tablo 3.7; Mikroplastığın *G. mellonella*’da LPO aktivitesine etkisi.

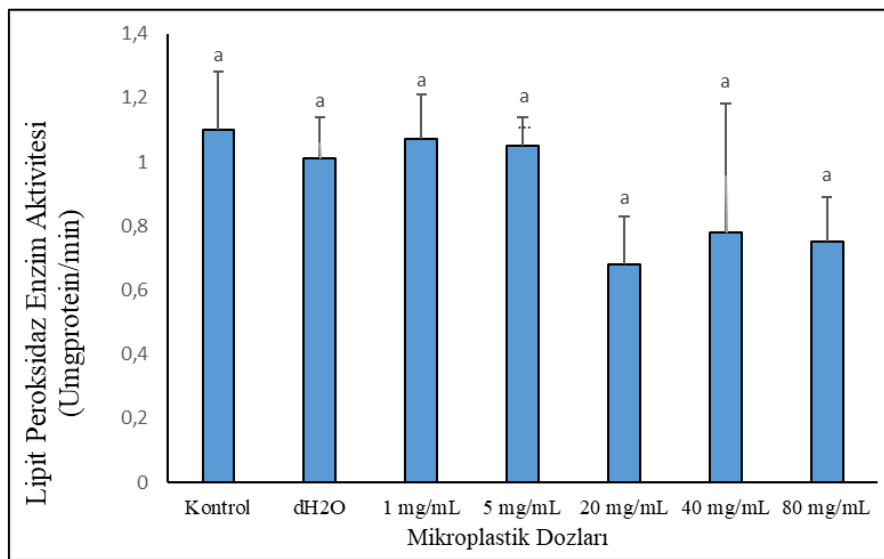
Dozlar	Kontrol	dH ₂ O	1 mg/mL	5 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL	80 mg/mL
Lipit Peroksidaz (U/mg.protein)	1,10 ± 0,18 ^a	1,01 ±0,13 ^a	1,07 ±0,14 ^a	1,05 ±0,09 ^a	0,68 ±0,15 ^b	0,78 ±0,40 ^b	0,75 ±0,14 ^b

* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

** Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (P>0,05, Tukey HSD Testi).

*** F=12,259; sd=6, 105; P= 0,00

Elde edilen istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 20,40 ve 80 mg/ mL dozlarının anlamlı olarak düşüş gösterdiği bulunmuştur. LPO miktarı en yüksek 1 mg/mL de (1,07); en düşük 20 mg/mL de (0,68) görülmüştür. Kontrol, dH₂O, 1 ve 5 mg/mL enjeksiyon grupları arasında farklılık bulunmazken, 20-80 mg/mL grupları ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir (p<0,05). MDA seviyesi ölçümlerine göre 20-80 mg/mL arası mikroplastik enjeksiyonu lipit peroksidasyonunu azaltmaktadır.



Şekil 6.11; Mikroplastik enjeksiyonu sonucu *G. mellonella* hemolenfinde malondialdehit miktarı

3.2.5 Fenoloksidaz (PO) Enzim Aktivitesindeki Değişimler

Fenoloksidaz aktivitesi unit/mg.protein cinsinden ifade edilecek şekilde hesaplanmış olup Tablo 3.8 ve Şekil 3.12’de verilmiştir. Değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. PO miktarı en yüksek kontrol grubunda (0,0037); en düşük dH₂O grubunda (0,0025) görülmüştür.

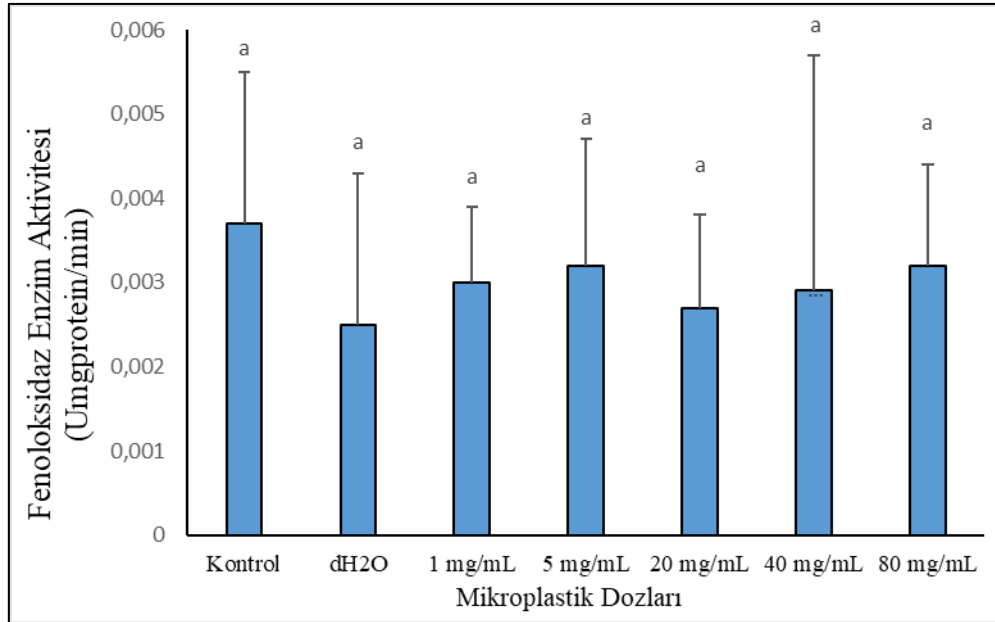
Tablo 3.8; Mikroplastığın *G. mellonella*’da PO aktivitesine etkisi.

Dozlar	Kontrol	dH ₂ O	1 g/mL	5 mg/ mL	20 mg/mL	40 mg/mL	80 mg/mL
Fenoloksidaz (U/mg.protein/min)	0,0037 ±0,0018 ^a	0,0025 ±0,0018 ^a	0,0030 ±0,0009 ^a	0,0032 ±0,0015 ^a	0,0027 ±0,0011 ^a	0,0029 ±0,0028 ^a	0,0032 ±0,0012 ^a

* Ortalama hücre sayısı yapılan üç tekrarda kullanılan toplam 15 bireyden elde edilen sonuç

** Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (P>0,05, Tukey HSD Testi).

*** F=0,854; sd=6, 105; P= 0,532



Şekil 7.12; Mikroplastik enjeksiyonu sonucu *G. mellonella* hemolenfinde fenoloksidaz enzim aktivitesi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

G. mellonella'da mikroplastığın hemosit sayısı üzerindeki sonuçlarına göre kontrol grupları ile mikroplastik enjeksiyonlu gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir. Enkapsülasyon 24. saatte güçlü enkapsülasyon grubunda kontrol grubuna göre bütün enjeksiyon gruplarında önemli bir azalma gözlemlenmiştir. 24. saatte olmamış melanizasyon grubunda kontrol grubuna göre 1, 5, 20 ve 40 mg/mL arasında fark vardır; zayıf melanizasyon grubunda kontrol grubu ve 40 mg/mL gruplarında fark görülmüştür; orta melanizasyon grubunda kontrol grubuna göre 20 ve 80 mg/mL gruplarında fark vardır; güçlü melanizasyon grubunda ise kontrol grubuna göre 1, 5, 20 ve 40 mg/mL gruplarında fark gözlemlenmiştir. Total protein miktarı sonuçlarına göre kontrol ile tüm enjeksiyon dozları arasında anlamlı bir farklılık vardır. Mikroplastik enjeksiyonu *G. mellonella* hemolenfinde total protein miktarında artışa neden olmuştur. Süperoksit dismutaz, katalaz ve fenoloksidaz enzim aktivitesi değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Lipit peroksidaz enzim aktivitesi değerlendirildiğinde 20-80 mg/mL grupları ile diğer enjeksiyon grupları arasındaki fark önemlidir. MDA seviyesi ölçümlerine göre 20-80 mg/mL arası mikroplastik enjeksiyonu lipit peroksidasyonunu azaltmaktadır.

Dolar ve arkadaşları (2021), *Porcellio scaber* hemosit sayısı üzerinde yaptıkları mikroplastik deneyinde, granülosit miktarında artış olduğunu göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada mikroplastik parçalarının *G. mellonella* üzerinde kontrol grubuna göre hemosit sayısında düşüş gözlemlenmiştir. Bazı araştırmalar, toplam hemosit sayısı artışlarının, cansız hemositleri canlı hemositlerle değiştirmek için geri besleme döngüsünü temsil ettiğini ileri sürmüştür (Fatima ve ark., 2014). Dolar ve arkadaşlarının deneyinde gözlemlenen sonuçun bununla ilişkili olduğunu söyleyebiliriz. Dolar ve arkadaşları (2022)'nin bir diğer *P. scaber* üzerindeki mikroplastik çalışmasının sonuçlarında mikroplastığe maruz bırakıldıktan sonra erken dönemde hemosit canlılığında hafif bir azalma eğilimine yol açtığını göstermişlerdir. Yaptığımız bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla aynı sonuca ulaşmıştır. Dolar ve arkadaşlarının bu çalışmasında toplam hemosit sayısındaki değişiklikler, kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Tek önemli değişiklik, *P. scaber*'in topraktaki %1,5'lik lastik parçacıklarına 4 gün maruz kalmasından sonra gözlenmiştir ve kontrole kıyasla neredeyse %60'luk önemli bir azalma görülmüştür. Trifuoggi ve arkadaşları (2019) *Sphaerechinus granularis* üzerinde yaptıkları bir çalışmada mikroplastığe maruz kalan embriyolarda mitotoksisite (aktif mitoz içermeyen embriyoların yüzdesi olarak) önemli ölçüde

artmış mitotik sapmalar olduğunu fade etmişlerdir. Lu ve arkadaşları (2021) polistiren mikroplastiklerin (PS-MP'ler) *Vicia faba* kökleri üzerindeki sitotoksitesi ve genotoksitesi incelemişlerdir ve *V. faba* köklerini 24, 48 ve 72 saat boyunca PS-MP'lere (10 nm) maruz bırakarak araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda kökteki mitotik indeks PS-MP'lerle işlenen numunedeki büyüme önemli ölçüde azalmıştır.

Wan ve arkadaşları (2019), larva zebra balıklarına; 7 gün boyunca, iki boyutta (5 ve 50 mm çapında) ve 100 ve 1000 mg/L olarak iki dozda floresan ve işlenmemiş polistiren mikroplastik parçalarına maruz bırakarak etkilerini değerlendirmişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre polistiren mikroplastiklere maruz kalmanın, larva zebra balığında metabolik profillerde değişikliklere neden olduğunu, enerji metabolizması, glikolipid metabolizması, inflamatuvar yanıt, nörotoksik yanıt, nükleik asit metabolizması ve oksidatif strese diferansiyel metabolitlerin rol oynadığını, ayrıca katalaz aktivitelerini ve glutatyon içeriğini önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir. Bununla birlikte; polistiren mikroplastiklere maruz kalmanın, glikolizle ilişkili genlerde ve lipid metabolizmasıyla ilişkili genlerde değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir.

Xiao ve arkadaşları (2020), polistiren mikroplastikler (PS-MP'ler) ile model tatlı su mikroalgi *Euglena gracilis* arasındaki etkileşimleri araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda süperoksit dismutaz aktivitelerinin, tüm PS-MP'lerle tedavi edilen gruplarda önemli ölçüde indüklendiğini, peroksidaz aktivitelerinde de, PS-MP'lere maruz kaldıktan sonra oksidatif stresin indüklendiğini gösteren iki boyuttaki (5 mm ve 0.1 mm) PS-MP'lerden önemli ölçüde etkilendiğini ve moleküler düzeyde, PS-MP'ler, hücrel süreçlerde, genetik bilgi işleme, organizma sistemlerinde ve metabolizmalarda yer alan genlerin ekspresyonunu düzensizleştirdiğini göstermişlerdir.

Ding ve arkadaşları (2018), çalışmalarında tatlı su balığı *Oreochromis niloticus* üzerinde mikroplastiklerin birikimini ve doku dağılımını ve ayrıca mikroplastiklerin *O. niloticus* üzerindeki biyokimyasal etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarının sonuçlarına göre karaciğerdeki antioksidatif enzim SOD aktivitesi, maruz kalma süresi boyunca önemli ölçüde indüklenirken, MDA içeriği, mikroplastiklere maruz kalma ile değişmediğini göstermişlerdir.

Jin ve arkadaşları (2021), polistiren mikroplastiklerin (PS MP'ler) farelerin erkek üremesindeki toksik etkileri araştırmışlardır. Çalışmalarının sonuçlarına göre spermatojenik hücrelerin absisleştiğini ve düzensiz bir şekilde ürettiğini, seminifer tübülde çok çekirdekli gonositlerin oluştuğunu göstermişlerdir ve PS-MP'ler testiküler inflamasyona, kan-testis bariyerinin bozulmasına neden olmuştur.

Cao ve arkadaşları (2017) çalışmalarında, topraklarda %0, 0,25, 0,5, 1 ve 2 (w/w) konsantrasyonlarında mikroplastiklere (Polistiren, 58 µm) maruz kalan solucanların (*Eisenia foetida*) yeni ortamlarına uyum güçlerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, mikroplastiklerin düşük konsantrasyonlar (\leq %0,5 (a/a)) altında solucanların hareketliliği üzerinde çok az etkiye sahip olduğunu, yüksek konsantrasyonlarda (yani, %1 ve %2) mikroplastiklere maruz kalmanın büyümeyi önemli ölçüde engellediğini ve solucan ölümlerini artırdığını göstermişlerdir.

Wang ve arkadaşları (2022), yaptıkları çalışmada sırasıyla 250, 500 ve 1000 µg/ml polistiren mikroplastiklere (PS-MP'ler, 1–10 µm) maruz kalan domuz testis (ST) hücre modelleri oluşturmuşlardır. Çalışmalarının sonucunda, PS-MP'lerin doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını, PS-MP'lere maruz kalma altında ST hücrelerinde apoptoz ve nekroz oluşumunu ve ilgili işaret genlerinin (B-hücreli lenfoma-2, Bcl-2 ilişkili X, Kaspaz-) ekspresyon değişikliklerini gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre mikroplastik enjeksiyonu tüm dozlarda kontrol gruplarına göre toplam hemosit sayısında anlamlı azalmaya neden olmuştur. Bunun muhtemel nedeni mikroplastiklerin hemositlerde apoptoz ve nekroza yol açmasıdır. Bunun yanında dolaşımdaki granülositlerin yabancı olarak algıladığı mikroplastikleri fagosite ediyor olması da hemosit sayısındaki değişimle alakalıdır. Yaptığımız çalışma esnasında granülositlerin sitoplazmaya yer bırakmayacak kadar yoğun şekilde mikroplastik parçalarını fagosite ettiğini belirledik. Mikroplastiklerin hücre içerisindeki birikimi metabolik faaliyetlerin gerçekleşmesini engelleyecek boyutta olduğu için, granülositlerin canlılığını yitirmesi, hemosit sayısında düşüşe neden oluyor olabilir.

Kaya ve arkadaşları (2020), *G. mellonella* larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada indol-3-asetikasite maruz bıraktıkları gruplarda enkapsülasyon hızındaki değişimlerin anlamlı olmadığı söylemişlerdir. Ancak melanize olmayan hemositlerde 4. saatte 5000 ppm'de kontrole göre artış

gösterdiğini söylemişlerdir. 50 ppm'de melanizasyonda güçlü bir düşüş ve 24 saatte melanize olmayan boncuk sayısında 50 ve 1000 ppm'de artış gözlemlenmiştir.

Kaya ve arkadaşları (2021)'nin model organizma *G. mellonella* üzerinde yaptıkları bir diğer çalışmada *Helichrysum arenarium* (Altın otu) özütünün enkapsülasyon ve melanizasyon etkilerine bakılmıştır ve çalışmalarının sonucunda elde edilen bulgulara göre *H. arenarium* %0,25 ve %0,5 doz enjeksiyonları dimetilsülfoksit (DMSO) gruplarına göre hemosit sayısında artışa neden olmuştur. Aynı zamanda, %0,25 ve %0,5 dozları, enjekte edilen diğer gruplara kıyasla güçlü bir enkapsülasyon-melanizasyon tepkisi gösterdiğini söylemişlerdir. Kaya ve arkadaşları (2021)'in sonuçlarına göre, *H. arenarium* ekstraktı yüksek dozlarda (%0,5'in üzerinde) anti-mitotik aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Kaya ve arkadaşları (2022), parazitoid yaban arısı *Pimpla turionellae* kaliks sıvısının konak *G. mellonella* hücre aracılı bağışıklık tepkisi ve hemosit canlılığı üzerindeki immünoşüpresif etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısının, kaliks sıvısı ile karşılaşmasından sonra konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir. Hem in vivo hem de in vitro tüm kaliks sıvısı dozlarında hücre canlılığında önemli azalmalar olduğundan da bahsetmişlerdir. Enkapsülasyon araçları olarak böceklere enjekte edilen boncukların analizleri, enkapsüle edilmiş boncuk sayısının, kaliks sıvısı enjeksiyonu sonrası kontrollere kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Çalışmada kullanılan en yüksek kaliks dozu olan 1 dişi eşdeğeri kaliks enjeksiyonunun, enjeksiyondan 24 saat sonra son instar larvalarının güçlü enkapsülasyon ve melanizasyon reaksiyonlarını tamamen engellemek için yeterli olduğunu söylemişlerdir.

Gwokyalıya ve Altuntaş (2019), *G. mellonella* larvalarını model olarak borik asit (BA)'nın insektisidal etkilerini ve toksik aktivitelerini immünolojik ve genotoksik etkiler açısından araştırmışlardır. BA konsantrasyonlarını (78.125–10.000 ppm) larvalara zorla besleme yöntemi kullanılarak uygulamışlardır ve tüm larva gruplarında konsantrasyona bağlı ölüm gözlemlenmiştir. Çalışmalarının sonuçlarında, toplam hemosit sayımlarında ciddi düşüşler gözlemlenmiştir. BA tedavisinden sonra canlı hücrelerde doza bağlı azalmalar, nekrotik ve apoptotik oranlarda artış gözlemlenmiştir ve larva hemositlerinin mitotik indekslerinin tüm BA konsantrasyonlarında değişmediğini belirtmişlerdir. BA'nın sitotoksik etkisinin, tedavi edilen larvaların enkapsülasyon, melanizasyon ve nodülasyon aktiviteleri gibi hücresel bağışıklık tepkilerinde önemli bir azalmaya yol açtığını, BA'nın en yüksek konsantrasyonda

mikronükleus oranlarını artırırken, *G. melonella* larva hemositlerinde DNA hasarını gösteren Comet parametrelerinin tüm konsantrasyonlarda artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Altuntaş ve arkadaşları (2022), Ethephon'un (ETF) model böcek *G. mellonella* larvalarının hücresel aracılı bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini belirledikleri öldürücü dozları (LD₂₅ ve LD₅₀) kullanarak araştırmışlardır. Çalışmalarının sonuçlarında, *G. mellonella* larvalarının ETF'ye maruz bırakılmasının, tüm dozlarda apoptotik ve nekrotik hücre oranlarını arttırdığını, dolaşımdaki hemosit sayısını ve canlı hücre sayısını önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca ETF, sferülosit, oenosit ve prohemosit sayısını, mitotik indeksleri arttırmış, dolaşımdaki granülosit sayısını azaltmış fakat plazmatosit sayısını değiştirmemiştir. Ayrıca in vivo enkapsülasyon sonuçları, her iki dozda da ETF ile müdahale edilmiş *G. melonella* larva hemositlerinin enkapsülasyon yeteneklerinin önemli ölçüde baskılandığını göstermiştir.

Yi ve arkadaşları (2016), parazit-konak modeli olarak nematod (*Steinernema carpocapsae* ve *Heterorhabditis bacteriophora*) kütikülleri ve *G. mellonella* larvalarını kullanarak, nematod kütikül enfeksiyonunun erken evresinde konağın doğuştan gelen bağışıklık parametrelerindeki değişiklikleri ve eikosanoidin biyosentez sürecindeki rolünü araştırmışlardır. Sonuçlarında, *S. carpocapsae* veya *H. bacteriophora* kütiküllerinin larva hemosölüne enjeksiyonunun her ikisinin de temel doğuştan gelen bağışıklık parametreleri olan hemosit yoğunluğu, mikroagregasyon, fagositoz ve hemositin kapsülleme yetenekleri ve fenoloksidaz ve antibakteriyel aktivitelerde önemli düşümlere yol açtığını ve parazit kütiküllerinin, konağının doğuştan gelen bağışıklık tepkisini aktif olarak baskılayabildiğini göstermişlerdir.

Dubovskiy ve arkadaşları (2011), *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde, enkapsülasyon, esterazlar, glutatyon S-transferaz (GST) ve fenoloksidaz aktivitesi üzerinde nikelin etkilerini araştırmışlardır. Düşük dozda nikel (10 µg g⁻¹) ile beslenen larvaların, nikel içermeyen bir diyetle beslenen kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek GST, fenoloksidaz aktivitesi ve enkapsülasyon tepkilerine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca ölümcül olmayan nikel dozu (50 µg g⁻¹) ile beslenen larvaların GST, esteraz aktivitesi ve enkapsülasyon oranlarını arttırdığını ancak fenoloksidaz aktivitesini azalttığını bulmuşlardır. Ölümcül olmayan nikel dozu doğuştan gelen bağışıklığı arttırsa da, bunun gerçek patojene karşı direnci azalttığını göstermişlerdir.

Uçkan ve arkadaşları (2010), *Pimpla turionellae* tarafından parazitlenme veya zehirlenmenin, konak *G. mellonella*'nin (Lepidoptera: Pyralidae) larva ve pupa evrelerinde enkapsülasyon ve melanizasyon tepkilerini etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Pupa içine zehir enjeksiyonundan 4 ve 24 saat sonra güçlü bir şekilde enkapsüle olmuş ve melanize edilmiş boncuk sayısının %50'den fazla azaldığını ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca enjeksiyondan 4 saat sonra son instar larvalarına öldürücü dozda zehir enjeksiyonunun (0,5 zehir eşdeğeri), hemositlerin boncukları enkapsüle etme yeteneğini %50'den fazla azalttığını belirtmişlerdir.

Dubovskii ve arkadaşları (2010), naylon implantların enkapsülasyon sürecinin geliştirilmesinde enzimatik antioksidan (süperoksit dismutaz, glutatyon-S-transferaz ve katalaz) aktivitelerinin yanı sıra *G. mellonella* lenflerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu incelemişlerdir. Kütikülün implantla delinmesinden 15 dakika sonra yüzeyinde bir kapsül oluştuğunu tespit etmişlerdir. Kapsülün aktif melanizasyonunun 4 saat sürdüğünü, implantın yerleştirilmesinden sonra, hemolenfte ROS oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiğini ve böcek hemositlerinde enzimatik antioksidan aktivitelerinde bir azalma ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızın enkapsülasyon sonuçlarına göre; mikroplastik enjeksiyonu sonucunda 4. Saatte kontrole göre 20 ve 40 mg/mL dozlarında güçlü enkapsülasyonu azaltmıştır. Benzer şekilde 24. saat sonunda tüm dozlarda güçlü enkapsülasyonu azaltmış, 20-80 mg/mL dozlarında zayıf enkapsülasyonu arttırmıştır.

Enkapsülasyon tepkisinde azalmanın nedeni granülositlerin görevlerini yerine getiremiyor olmasından kaynaklanması muhtemeldir. Enkapsülasyon tepkisinde kritik görevi olan granülositler mikroplastikleri fagosite ettikleri için, enkapsülasyon ajanının etrafında birikim azalttığı düşünülmektedir. Enkapsülasyon tepkisine paralel olarak melanizasyon tepkisinde de benzer sonuçlar görülmüştür. Melanize olmayan boncuk sayısında kontrole göre doz enjeksiyon gruplarında anlamlı artış vardır. Bu sonuçların; hemositlerin melanizasyondaki görevlerini etkin bir şekilde gerçekleştiremiyor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özetlenen literatürde de, hemosit sayısı ile enkapsülasyon-melanizasyon arasındaki doğru orantılı ilişki görülmektedir. Gwokyalya ve Altuntaş (2019), borik asitin sitotoksik etkisinin sonucunda *G. mellonella* larvalarında enkapsülasyon, melanizasyon ve nodülasyon aktivitelerinde önemli bir azalmaya yol açtığını belirlemişlerdir. Benzeri şekilde Kaya ve ark. (2022) çalışmasında da hemosit sayısındaki azalmaya paralel şekilde enkapsülasyon-melanizasyon tepkilerinde azalma görülmüştür. Yi ve ark. (2016)'nın çalışma sonuçlarında da hemosit sayısı ve enkapsülasyon

tepkisi arasında paralellik görülmüştür. Hemosit sayısındaki düşüş, enkapsülasyon ve melanizasyon tepkilerinde düşüşe neden olmaktadır. Çalışmamızın enkapsülasyon-melanizasyon sonuçları literatür ile uyumludur.

Curi ve arkadaşları (1998), yaptıkları çalışmada kültürlenmiş nötrofillerde bütünlük, ince yapı, fagositoz kapasitesi ve H_2O_2 , O_2^- ve NO_2^- üretimindeki değişiklikleri incelemişlerdir ve antioksidan enzimlerin (CAT, SOD ve glutatyon bağımlı peroksidaz GSH-Px) aktiviteleri benzer koşullar altında ölçülmüştür. Çalışmalarının sonucunda, 24 saat boyunca kültürlenen nötrofiller, azalmış fagositoz kapasitesi gösterirken, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde azalma ile gerçekleşen oksijen ve nitrojen reaktif türlerinin üretiminin, bu koşullar altında nötrofillerde gerçekleşen apoptoz sürecinde anahtar rol oynadığını belirtmişlerdir.

Tunçsoy ve arkadaşları (2019), bakır oksit nanoparçacıklarının (CuO NP'ler) etkilerini, *G. mellonella*'nın orta bağırsağı ve yağ gövdesinde araştırmışlardır. Dördüncü dönem larvaları, son dönem larvaları olana kadar $10 \mu g$ Cu/L CuO'ya maruz bırakmışlardır ve katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-s-transferaz (GST) ve asetilkolinesteraz (AChE) ve metal birikimini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarının sonunda, CuO NP'leri orta bağırsak ve yağ gövdesinde CAT aktivitelerini arttırırken, SOD aktivitelerini azalttığı sonucuna ulaşmışlardır. Büyükgüzel ve arkadaşları (2013), borik asidin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Kimyasalın, genellikle konsantrasyona bağlı bir şekilde, larvalar için toksik olduğu sonucuna ulaşmışlardır ve maruz kalan gruplarda lipid peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde artış söz konusu olmuştur. Liu ve arkadaşları (2020) polistiren nanoplastiğe maruz bırakılan *Daphnia pulex*'te reaktif oksijen türlerinin (ROS) içeriği, MAPKHIF-1/NFkB yolundaki gen ve protein ekspresyonu, antioksidan gen ekspresyonları ve enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir. Sonuçlarına göre nanoplastiğin düşük doza bağlı etkilerle birlikte ROS'un aşırı üretimine neden olduğunu ve doz konsantrasyonu arttıkça antioksidan enzimlerin (CAT, toplam SOD ve CuZn SOD) aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir.

Umamaheswari ve arkadaşları (2021), polistiren mikroplastiklere (PS-MP'ler) maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) solungaçlarında apoptozun altında yatan bir dizi moleküler olayı araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda farklı konsantrasyonlardaki (10 ve $100 \mu g L^{-1}$) PS-MP'ler, sırasıyla oksidatif ve bağışıklık savunma mekanizmasını etkileyen reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu indüklediğini belirtmişlerdir.

Chi ve arkadaşları (2022), polistiren nanoplastik (NP) maruziyetinin neden olduğu karaciğer hasarının içsel mekanizmasını araştırmışlardır ve farelerin deoksiribonükleaz I (DNaz I) kaplı PSNP'lere maruz kalması sağlanmıştır. Sonuçlarına göre, nötrofil hücre dışı tuzağı (NET) in vivo, karaciğerde nötrofil infiltrasyonunu azaltmıştır, ROS NLRP₃ eksenini inhibe etmiştir ve sitokinlerin ekspresyonunu belirgin şekilde azaltmıştır. Yang ve arkadaşları (2022), polistiren nano ve mikro partiküllerin fetüsler üzerindeki potansiyel toksisitesi üzerinde çalışma yapmışlardır ve sonuçlarında PS nanoparçacıkların, glutatyon takviyesi ile önlenen nöronal hücre hatlarında aşırı ROS ve apoptoza neden olduğunu belirtmişlerdir.

Shengchen ve arkadaşları (2021), iki boyutlu polistiren mikroplastiklerin (PS-MP'ler, 1–10 µm ve 50–100 µm) anterior tibial (TA) kas büyümesi ve farelerde yaralanma sonrası onarım üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, PS-MP tedavisinin miyoblastın hücre canlılığını etkilememesine rağmen, hücre içi ROS oluşumunu ve oksidatif stresi şiddetlendirdiğini, p38 MAPK'nın fosforilasyonunu azaltarak miyojenik farklılaşmayı inhibe ettiğini ve NF-κB ifadesini artırarak adipojenik farklılaşmayı desteklediğini göstermişlerdir. Li ve arkadaşları (2021), yaptıkları çalışmada polistiren mikroplastiklerin hepatosit apoptozunu ve ROS kaynaklı kalsiyum aşırı yüklenmesi yoluyla anormal glikolitik akışı tetiklediğini gözlemlemişlerdir.

Wu ve arkadaşları (2022), çalışmalarında sazanları 28 gün boyunca sırasıyla üç parçacık boyutuna (50 nm, 100 nm ve 400 nm) sahip polistiren NP'lerin (1000 µg/L, PS-NP'ler) sulu ortamına doğrudan maruz bırakmışlardır. Çalışma sonucunda, H&E ve TUNEL boyaması, üç çaplı PS-NP'lere maruz kalmanın hepsinin sazanlarda miyokardiyal doku iltihabına ve kardiyomiyosit apoptozuna neden olduğunu, ROS içeriğinin önemli ölçüde arttığını, antioksidan enzimlerin (CAT, SOD1 ve Gpx1) aktivitelerinin azaldığını ve MDA'nın biriktiğini göstermişlerdir. Liang ve arkadaşları (2021), farelerde tek ve birlikte maruz kalma koşulları altında üç polistiren (PS) partikülünün (50 nm PS, PS50; 500 nm PS, PS500; 5000 nm PS, PS5000) biyolojik dağılımını ölçmüşlerdir ve farelerin dört bağırsak segmentinde (duodenum, jejunum, ileum ve kolon) bağırsak bariyerinin üç ana bileşeni (mukus tabakası, sıkı bağlantılar ve epitel hücreleri) üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlarında, PS mikro ve nanoplastiklerin bağırsak bariyeri disfonksiyonu üzerindeki kombine toksisitesinin, farelerde esas olarak reaktif oksijen türleri (ROS) aracılı epitel hücre apoptozundan kaynaklandığını bulmuşlardır. Bulgularımıza göre antioksidan enzimlerden SOD ve CAT aktivitesi üzerinde mikroplastiklerin bir etkisi bulunmamaktadır. Bununla birlikte lipid peroksidasyonu sonucu

oluşan MDA miktarında 20-80 dozlarında azalma görülmüştür. Özetlenen literatüre göre mikroplastik maruziyeti ROS oluşumunu arttırırken antioksidan enzim aktivitesini azaltmaktadır. Bununla birlikte mikroplastik parçacıklarının toksitesini ile boyutları arasında kolerasyon bulunmaktadır (Wu ve ark., 2022), maruz kalınan mikroplastik parçası ne kadar küçük ise meydana gelen toksik etki o denli yüksek olmaktadır (Wu ve ark., 2022). Çalışmamızda kullanılan mikroplastik boyutu (1 µm), fagosite edilecek kadar küçük, enkapsülasyona neden olmayacak kadar büyük olacak şekilde belirlenmiştir. Mikroplastik parçacıkları ROS üretimini arttırarak apoptotik mekanizmayı çalıştırarak hücre ölümüne neden olmuş, ancak antioksidan enzimler üzerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Elde edilen bu bulgu özetlenen literatür ile uyumludur. ROS üretiminin artması ile antioksidan enzim aktivitelerinin artması beklenmektedir, ancak mikroplastik parçalarının antioksidan enzim aktivitesini azaltması elde edilen bulguların en muhtemel açıklamasıdır.

Kaya (2020), *G. mellonella* üzerinde yaptığı fenoloksidaz enzim aktivitesi çalışmasında, piretrum insektisitini kullanmıştır. Bu çalışmadan elde ettiği bulgularda, 0,6 mg/mL piretrum insektisitinin fenoloksidaz enzim aktivitesini arttırdığını göstermiştir. Bu dozun üzerindeki ve altındaki dozların fenoloksidaz aktivitesinde kontrol gruplarına göre önemli bir değişikliğe neden olmadığını belirtmiştir.

Kaya ve Türkdoğan (2021), *G. mellonella* larvalarına zeytin yaprağı özütü enjekte ederek fenoloksidaz enzim aktivitesini ölçmüşlerdir. Bu çalışmadan elde ettikleri bulgularda, zeytin yaprağı ekstraktının 0,001 mg/mL dozunda fenoloksidaz aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir.

Silva ve arkadaşları (2021), *Chironomus riparius* üzerinde 32–63 µm boyutlarındaki mikroplastiklerin yutulmasına bağlı olarak böceklerin fenoloksidaz enzim aktivitesini gözlemlemiştir. Deneylerinin sonucunda mikroplastiklerin larvalar tarafından yutulması, 5 ve 20 g PE-MP'ler kg⁻¹'de bazal PO aktivitesinde sırasıyla %26 ve %29 oranında önemli bir artışa tetiklediğini göstermişlerdir.

Kaya ve arkadaşları (2021), çeşitli dozlarda *Hypericum arenarium*'un *G. mellonella* larvalarının fenoloksidaz aktivitesi üzerinde tıpkı hemosit sayısı ve güçlü enkapsülasyon-melanizasyon tepkisinde olduğu gibi %0,25 ve %0,5 dozlarında artışa neden olduğunu gözlemlemiştir.

Coates ve arkadaşları (2019), *G. mellonella* larvalarının, hemosölüne doğrudan enjeksiyon ve gavaj (zorla besleme) yoluyla fizyolojik olarak uygun dozlarda okadaik asit vermişlerdir. Okadaik asitin ≥ 242 $\mu\text{g}/\text{kg}$ konsantrasyonlarında verilmesinden sonraki 24 saat içinde hayatta kalan larva sayısında ve dolaşımdaki hemosit sayılarında önemli düşümlere yol açtığından bahsetmişlerdir. Hemolenfte, okadaik asitin hemosit canlılığını azalttığını ve fenolksidaz aktivitelerini arttırdığını belirtmişlerdir.

Aksan ve arkadaşları (2022), bitki gelişim düzenleyicisi indol-3-asetik asidin (IAA) *G. mellonella* ve parazitoit *Pimpla turionellae* üzerindeki hemolitik aktivite ve fenolksidaz aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda, *G. mellonella* hemolenfindeki fenolksidaz aktivitesinin, kontrole kıyasla tüm IAA dozlarında önemli ölçüde azaldığını, ancak *P. turionellae* hemolenfindeki fenolksidaz aktivitesindeki azalmaların 500 ila 10,000 ppm arasında anlamlı olduğunu göstermişlerdir.

Melanizasyonda görevli olan PO özellikle fagosite edilemeyecek kadar büyük istilacılara karşı aktif olarak görev yapmaktadır. Çalışmamız kapsamında *G. mellonella* larvalarına enjekte edilen mikroplastik parçaları granülositler tarafından fagosite edildiği belirlenmiştir. Mikroplastiklerin PO aktivitesi üzerindeki etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Silva ve ark. (2021) çalışmalarında, 32–63 μm boyutlarındaki mikroplastiklerin PO aktivitesini arttırdığını belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızın sonuçları ise 1 μm boyundaki mikroplastik partiküllerinin PO aktivitesini değiştirmediğini göstermektedir. Bu iki çalışma arasındaki en önemli farklılık mikroplastik parçalarının boyutlarıdır. Silva ve ark. (2021) kullandığı mikroplastik boyutu, *G. mellonella*'da enkapsülasyon tepkisine neden olacak kadar büyüktür, oysaki bizim çalışmamızda kullandığımız mikroplastik boyutu 1 μm 'dir. *G. mellonella* larvaları immünolojik maaliyeti düşürmek için inokülünlerin boyutu ve miktarına uygun yoğunluk ve araçlarla immün yanıt oluşturmaktadır (Wu ve ark., 2016). Kullandığımız mikroplastik boyutundan kaynaklı olarak PO aktivasyonu yerine fagositoz tepkisinin oluşması nedeni ile çalışmamızda PO aktivitesinde bir değişiklik meydana gelmediğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonuçlarına göre mikroplastikler *G. mellonella* hemositleri üzerinde sitotoksik etki oluşturarak hemosit aracılı bağışıklık yanıtlarını azaltmış, antioksidan enzim aktivitesinde ve PO aktivitesinde değişikliğe neden olmamıştır. Küçük boyutlu mikroplastiklerin savunma hücreleri tarafından fagositozu, bağışıklık tepkilerinin azalmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar bize 1 mikron boyunda mikroplastiklerin enzimatik aktiviteleri etkilemeden sitotoksik etki

göstererek bağışıklık sistemini zayıflattığı ve dolaylı olarak canlıları diğer patojenlerin etkilerine karşı savunmasız bırakarak tehlikeli sonuçlara yol açtığını göstermektedir. Giderek büyüyen bir çevre problemi olan mikroplastikler hem karasal hem de sucul hayatı artan oranda tehdit etmektedir. Bu sorunun çözülmemesi durumunda hem karasal hem sucul canlıların ölümcül sonuçlarla yüzleşmesi gerekecektir. Tez çalışmamızın sonuçları mikroplastiklerin boyutlarına göre vücutta hasar oluşturduğunu bunun yanında hangi boyutta olursa olsun canlı yaşamı tehlikeye soktuğu açık bir şekilde görülmektedir.

5. KAYNAKLAR

AbdelRahman, Y. M., and Belland, R. J. (2005). The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 949-959.

Adema, C. V., van Deutekom-Mulder, E. C., Van Der Knaap, W. P. W., and Sminia, T. (1993). NADPH-oxidase activity: the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Leukocyte Biology*, 54(5), 379-383.

Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 593-623.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

Akhbarizadeh, R., Dobaradaran, S., Nabipour, I., Tajbakhsh, S., Darabi, A. H., and Spitz, J. (2020). Abundance, composition, and potential intake of microplastics in canned fish. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111633.

Aksan, G. B., Uçkan, F., and Aylin, E. R. (2022). Influence of dietary indole-3-acetic acid on phenoloxidase and hemolytic activities in *Pimpla turionellae* L., 1758 (Hymenoptera: Ichneumonidae) and *Galleria mellonella* L., 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) in a host-parasitoid system. *Turkish Journal of Entomology*, 46(2), 149-158.

Altuntaş, H., Gwokyalaya, R., and Bayram, N. (2022). Immunotoxic effects of force-fed ethephon on model organism *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Drug and Chemical Toxicology*, 45(4), 1761-1768.

Altuntaş, H., Kılıç, A. Y., Uçkan, F., and Ergin, E. (2012). Effects of gibberellic acid on hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, 41(3), 688-696.

Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605.

Andrady, A. L. (2017). The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 12-22.

Arnhold, J. (2004). Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)*, 69(1), 4-9.

- Auta, H. S., Emenike, C. U., and Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, *102*, 165-176.
- Baggiolini, M., and Wymann, M. P. (1990). Turning on the respiratory burst. *Trends in Biochemical Sciences*, *15*(2), 69-72.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., and Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1526), 1985-1998.
- Ben-Ami, R. (2011). Innate immunity against moulds: lessons learned from invertebrate models. *Immunological Investigations*, *40*(7-8), 676-691.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., and Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, *12*(1), 64-76.
- Bøhn, M., Bakken, A., Erikssen, J., and Berg, K. (1994). The apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion polymorphism is not associated with myocardial infarction in Norway. *Clinical Genetics*, *45*(5), 255-259.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.
- Bronskill, J. (1961). A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *Journal of the Lepidopterists' Society*, *15*(2), 102-104.
- Browne, N., Heelan, M., and Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, *4*(7), 597-603.
- Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310). Academic press.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*, *23*(4-5), 329-344.
- Bulet, P., Stöcklin, R., and Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, *198*(1), 169-184.

Bunch, T. A., and Brower, D. L. (1992). *Drosophila* PS2 integrin mediates RGD-dependent cell-matrix interactions. *Development*, 116(1), 239-247.

Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Snela, M., Erdem, M., Radtke, K., Ziemnicki, K., and Adamski, Z. (2013). Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell biology and Toxicology*, 29(2), 117-129.

Camejo, G., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., and Bondjers, G. (1998). Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*, 139(2), 205-222.

Cao, D., Wang, X., Luo, X., Liu, G., and Zheng, H. (2017, April). Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 61, No. 1, p. 012148). IOP Publishing.

Chain, B. M., and Anderson, R. S. (1982). Selective depletion of the plasmatocytes in *Galleria mellonella* following injection of bacteria. *Journal of Insect Physiology*, 28(4), 377-384.

Chang, X., Xue, Y., Li, J., Zou, L., and Tang, M. (2020). Potential health impact of environmental micro-and nanoplastics pollution. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 4-15.

Charalambidis, N. D., Zervas, C. G., Lambropoulou, M., Katsoris, P. G., and Marmaras, V. J. (1995). Lipopolysaccharide-stimulated exocytosis of nonself recognition protein from insect hemocytes depend on protein tyrosine phosphorylation. *European Journal of Cell Biology*, 67(1), 32-41.

Cheng, L. R., and Butler, K. (1989). Code-switching: a natural phenomenon vs language 'deficiency'. *World Englishes*, 8(3), 293-309.

Cherbas, L. (1973). The induction of an injury reaction in cultured haemocytes from saturniid pupae. *Journal of Insect Physiology*, 19(10), 2011-2023.

Chi, Q., Xu, T., He, Y., Li, Z., Tang, X., Fan, X., and Li, S. (2022). Polystyrene nanoparticle exposure supports ROS-NLRP3 axis-dependent DNA-NET to promote liver inflammation. *Journal of Hazardous Materials*, 439, 129502.

Christensen, N. D., Wisinger, C. E., Maynard, L. A., Chauhan, N., Schubert, J. T., Czuba, J. A., and Barone, J. R. (2020). Transport and characterization of microplastics in inland waterways. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101640.

- Clark, K. D., Witherell, A., and Strand, M. R. (1998). Plasmacyte Spreading Peptide Is Encoded by an mRNA Differentially Expressed in Tissues of the Moth *Pseudoplusia includens*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(2), 479-485.
- Coates, C. J., Lim, J., Harman, K., Rowley, A. F., Griffiths, D. J., Emery, H., and Layton, W. (2019). The insect, *Galleria mellonella*, is a compatible model for evaluating the toxicology of okadaic acid. *Cell Biology and Toxicology*, 35(3), 219-232.
- Cook, S. M., and McArthur, J. D. (2013). Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*, 4(5), 350-353.
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., and Fernández-de-Puelles, M. L. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10239-10244.
- Curi, T. C. P., De Melo, M. P., Palanch, A. C., Miyasaka, C. K., and Curi, R. (1998). Percentage of phagocytosis, production of O₂⁻, H₂O₂ and NO, and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture. *Cell Biochemistry and Function: Cellular Biochemistry and Its Modulation By Active Agents or Disease*, 16(1), 43-49.
- Çiğremiş, Y. (1997). Sigara tiryakilerinde eritrosit içi süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri (Master's thesis).
- Dalton, T. P., Shertzer, H. G., and Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 67-101.
- Davies, D. H., Hayes, T. K., and Vinson, S. B. (1988). Preliminary characterization and purification of invitro encapsulation promoting factor: A peptide that mediates insect haemocyte adhesion. *Developmental and Comparative Immunology*, 12(2), 241-253.
- De-la-Torre, G. E. (2020). Microplastics: an emerging threat to food security and human health. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1601-1608.
- Dewald, B. (1997). Moser B. Human chemokines: an update. *Annual Review of Immunology*, 15, 675-705.
- Ding, J., Zhang, S., Razanajatovo, R. M., Zou, H., and Zhu, W. (2018). Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution*, 238, 1-9.

- do Sul, J. A. I., and Costa, M. F. (2014). The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution*, 185, 352-364.
- Dolar, A., Drobne, D., Dolenc, M., Marinšek, M., and Kokalj, A. J. (2022). Time-dependent immune response in *Porcellio scaber* following exposure to microplastics and natural particles. *Science of The Total Environment*, 818, 151816.
- Dolar, A., Selonen, S., van Gestel, C. A., Perc, V., Drobne, D., and Kokalj, A. J. (2021). Microplastics, chlorpyrifos and their mixtures modulate immune processes in the terrestrial crustacean *Porcellio scaber*. *Science of the Total Environment*, 772, 144900.
- Dubovskii, I. M., Grizanova, E. V., Chertkova, E. A., Slepneva, I. A., Komarov, D. A., Vorontsova, Y. L., and Glupov, V. V. (2010). Generation of reactive oxygen species and activity of antioxidants in hemolymph of the moth larvae *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) at development of the process of encapsulation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 46(1), 35-43.
- Dubovskiy, I. M., Grizanova, E. V., Ershova, N. S., Rantala, M. J., and Glupov, V. V. (2011). The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Chemosphere*, 85(1), 92-96.
- Dunn, P. E. (1986). Biochemical aspects of insect immunology. *Annual Review of Entomology*, 31(1), 321-339.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2016). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *Efsa Journal*, 14(6), e04501.
- Er, A., Taşkıran, D., and Sak, O. (2017). Azadirachtin-induced effects on various life history traits and cellular immune reactions of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Biological Sciences*, 69(2), 335-344
- Er, A., Uçkan, F., Rivers, D. B., and Sak, O. (2011). Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid *Pimpla turionellae* on hemocytes of the host *Galleria mellonella*. *Journal of Applied Entomology*, 135(3), 225-236.

- Eriksson, C., and Burton, H. (2003). Origins and biological accumulation of small plastic particles in fur seals from Macquarie Island. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 32(6), 380-384.
- Fatima, M., Tariq, M., and Gulzar, A. (2014). Effect of triflumuron and diafenthiuron on the haemocytes of American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pakistan Entomologist*, 36, 51-56.
- Fearon, D. T. (1997). Seeking wisdom in innate immunity. *Nature*, 388(6640), 323-324.
- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of insect Biochemistry and Physiology*, 29(2), 187-197.
- Fendall, L. S., and Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, 58(8), 1225-1228.
- Fessler, J. H., and Fessler, L. I. (1989). Drosophila extracellular matrix. *Annual Review of Cell Biology*, 5(1), 309-339.
- Firacative, C., Khan, A., Duan, S., Ferreira-Paim, K., Leemon, D., and Meyer, W. (2020). Rearing and maintenance of *Galleria mellonella* and its application to study fungal virulence. *Journal of Fungi*, 6(3), 130.
- Flohé, L., & Ötting, F. (1984). Formation or removal of oxygen radicals. *Methods in Enzymology*, 105, 92-104.
- Foyer, C. H., and Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(4), 861-905.
- Geng, C., and Dunn, P. E. (1988). Hemostasis in larvae of *Manduca sexta*: Formation of a fibrous coagulum by hemolymph proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 155(2), 1060-1065.
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R., and Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 611-643.
- Götz, P. (1986). Mechanisms of encapsulation in dipteran hosts. *In Symposia of the Zoological Society of London* (No. 56, pp. 1-19).

- Gupta, A. P. (1979). Haemocytes Types: Their Structures, Synonymics, Interrelationships, and Taxonomic Significance. *Insect Hemocytes: Development Forms, Functions and Techniques*, 85-127.
- Gwokyalaya, R., and Altuntaş, H. (2019). Boric acid-induced immunotoxicity and genotoxicity in model insect *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 101(4), e21588.
- Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S., and Lee, W. J. (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*, 310(5749), 847-850.
- Hall, N. M., Berry, K. L. E., Rintoul, L., and Hoogenboom, M. O. (2015). Microplastic ingestion by scleractinian corals. *Marine Biology*, 162(3), 725-732.
- Ham, P. J. (1992). Immunity in haematophagous insect vectors of parasitic infection. *In Advances in Disease Vector Research* (pp. 101-149). Springer, New York, NY.
- Handy, R. D., and Shaw, B. J. (2007). Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk and Society*, 9(2), 125-144.
- Hantoro, I., Löhr, A. J., Van Belleghem, F. G., Widianarko, B., and Ragas, A. M. (2019). Microplastics in coastal areas and seafood: implications for food safety. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 36(5), 674-711.
- Hoffmann, J. A. (1995). Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*, 7(1), 4-10.
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426(6962), 33-38.
- Hortsch, M., and Goodman, C. S. (1991). Cell and substrate adhesion molecules in *Drosophila*. *Annual Review of Cell Biology*, 7(1), 505-557.
- Hultmark, D. (1993). Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends in Genetics*, 9(5), 178-183.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., and Boman, H. G. (1980). Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 106(1), 7-16.

Humphries, M. J. (2012). Peptide sequences in matrix proteins recognized by adhesion receptors. *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes: Cell Biology*, 289.

Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 11-25.

İzzetoğlu, S. (2012). A new approach for classification of major larval hemocytes (prohemocytes, plasmatocytes and granulocytes) in the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) by acridine orange staining. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 36(2), 163-168.

Jin, H., Ma, T., Sha, X., Liu, Z., Zhou, Y., Meng, X., and Ding, J. (2021). Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123430.

Jorjão, A. L., Oliveira, L. D., Scorzoni, L., Figueiredo-Godoi, L. M. A., Cristina A. Prata, M., Jorge, A. O. C., and Junqueira, J. C. (2018). From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*, 9(1), 383-389.

Kavanagh, K., and Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(1), 101-112.

Kaya (2020). The Effects Of Pyrethrum Extract On *Galleria Mellonella* Hemolymph Phenoloxidase Enzyme. *Journal of Scientific Perspectives*, 4(4), 269-280.

Kaya, S. (2015). Konağa verilen indol-3-asetik asitin ve kaliks sıvısının konak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ve parazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) hemositlerine etkisi. (*Doktora Tezi*)

Kaya, S. and Türkdoğan, S. (2021). The Olive Leaf Extract Induced Phenoloxidase Activity Changes in *Galleria mellonella* Hemolymph. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 8(4), 934-939.

Kaya, S., Akkuş, G., Türkdoğan, S., and Gündüz, B. (2021). Influence of Helichrysum arenarium on hemocyte-mediated immune responses and phenoloxidase enzyme activity of model organism *Galleria mellonella* (L.). *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(4), 2521-2528.

Kaya, S., Uçkan, F., and 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. *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(1), 169-179.

Kaya, S., Uçkan, F., and Er, A. (2022). Immunosuppressive influence of parasitoid wasp *Pimpla turionellae* calyx fluid on host *Galleria mellonella* cell-mediated immune response and hemocyte viability. *Bulletin of Entomological Research*, 112(3), 361-369.

Kocsy, G., Tari, I., Vanková, R., Zechmann, B., Gulyás, Z., Poór, P., and Galiba, G. (2013). Redox Control of Plant Growth and Development. *Plant Science*, 211, 77-91.

Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K., and Fombong, A. T. (2017). The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8(2), 61.

Lamprou, I., Tsakas, S., Theodorou, G. L., Karakantza, M., Lampropoulou, M., and Marmaras, V. J. (2005). Uptake of LPS/E. coli/latex beads via distinct signalling pathways in medfly hemocytes: the role of MAP kinases activation and protein secretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1744(1), 1-10.

Lange, A., Beier, S., Huson, D. H., Parusel, R., Iglauer, F., and Frick, J. S. (2018). Genome sequence of *Galleria mellonella* (greater wax moth). *Genome Announcements*, 6(2), e01220-17.

Lavine, M. D., and Strand, M. R. (2001). Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology*, 47(9), 965-974.

Lavine, M. D., and Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295-1309.

Lavine, M. D., and Strand, M. R. (2003). Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple α and β integrin subunits. *Insect Molecular Biology*, 12(5), 441-452.

Lee, J. C., Son, Y. O., Pratheeshkumar, P., and Shi, X. (2012). Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4), 742-757.

Li, S., Ma, Y., Ye, S., Tang, S., Liang, N., Liang, Y., and Xiao, F. (2021). Polystyrene microplastics trigger hepatocyte apoptosis and abnormal glycolytic flux via ROS-driven calcium overload. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 126025.

- Liang, B., Zhong, Y., Huang, Y., Lin, X., Liu, J., Lin, L., and Huang, Z. (2021). Underestimated health risks: polystyrene micro- and nanoplastics jointly induce intestinal barrier dysfunction by ROS-mediated epithelial cell apoptosis. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1), 1-19.
- Limonta, G., Mancina, A., Benkhalqui, A., Bertolucci, C., Abelli, L., Fossi, M. C., and Panti, C. (2019). Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
- Ling, E., and Yu, X. Q. (2005). Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(12), 1356-1366.
- Liu, Z., Huang, Y., Jiao, Y., Chen, Q., Wu, D., Yu, P., and Zhao, Y. (2020). Polystyrene nanoplastic induces ROS production and affects the MAPK-HIF-1/NFκB-mediated antioxidant system in *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology*, 220, 105420.
- Liu, Z., Yu, P., Cai, M., Wu, D., Zhang, M., Chen, M., and Zhao, Y. (2019). Effects of microplastics on the innate immunity and intestinal microflora of juvenile *Eriocheir sinensis*. *Science of The Total Environment*, 685, 836-846.
- Lu, Y., Ma, Q., Xu, X., Yu, Z., Guo, T., and Wu, Y. (2021). Retracted: Cytotoxicity and genotoxicity evaluation of polystyrene microplastics on *Vicia faba* roots. *Environmental Pollution*, 288, 117821.
- Luo, K., and Pang, Y. (2006). Spodoptera litura multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis. *Journal of Insect Physiology*, 52(8), 795-806.
- Marmaras, V. J., and Lampropoulou, M. (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling*, 21(2), 186-195.
- Mavrouli, M. D., Tsakas, S., Theodorou, G. L., Lampropoulou, M., and Marmaras, V. J. (2005). MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1744(2), 145-156.
- Meister, M., and Lagueux, M. (2003). Drosophila blood cells. *Cellular Microbiology*, 5(9), 573-580.

- Mercogliano, R., Avio, C. G., Regoli, F., Anastasio, A., Colavita, G., and Santonicola, S. (2020). Occurrence of Microplastics in Commercial Seafood under the Perspective of the Human Food Chain. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(19), 5296-5301.
- Mikulak, E., Gliniewicz, A., Przygodzka, M., and Solecka, J. (2018). *Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies. *Education*, 1, 2.
- Moore, C. J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 108(2), 131-139.
- Murphy, F., and Quinn, B. (2018). The effects of microplastic on freshwater *Hydra attenuata* feeding, morphology and reproduction. *Environmental Pollution*, 234, 487-494.
- Nakatogawa, S. I., Oda, Y., Kamiya, M., Kamijima, T., Aizawa, T., Clark, K. D., and Hayakawa, Y. (2009). A novel peptide mediates aggregation and migration of hemocytes from an insect. *Current Biology*, 19(9), 779-785.
- Nappi, A. J., and Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, 22(5), 469-480.
- Nappi, A. J., and Vass, E. (2001). Cytotoxic reactions associated with insect immunity. *Phylogenetic Perspectives on The Vertebrate Immune System*, 329-348.
- Nappi, A. J., Kohler, L., and Mastore, M. (2004). Signaling pathways implicated in the cellular innate immune responses of *Drosophila*. *Invertebrate Survival Journal*, 1(1), 5-33.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., and Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology*, 68(4), 450-456.
- Neuwirth, M. (1973). The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Journal of Morphology*, 139(1), 105-123.
- Pandey, J. P., and Tiwari, R. K. (2012). An overview of insect hemocyte science and its future application in applied and biomedical fields. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(3), 82-105.
- Pech, L. L., and Strand, M. R. (1996). Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science*, 109(8), 2053-2060.

- Pech, L. L., Trudeau, D., and Strand, M. R. (1994). Separation and behavior in vitro of hemocytes from the moth, *Pseudoplusia includens*. *Cell and Tissue Research*, 277(1), 159-167.
- Pereira, M. F., Rossi, C. C., da Silva, G. C., Rosa, J. N., and Bazzolli, D. M. S. (2020). *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathogens and Disease*, 78(8), ftaa056.
- Pereira, T. C., De Barros, P. P., Fugisaki, L. R. D. O., Rossoni, R. D., Ribeiro, F. D. C., De Menezes, R. T., and Scorzoni, L. (2018). Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *Journal of Fungi*, 4(4), 128.
- Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309(5963), 30-33.
- PlasticsEurope, 2017. Plastics - the Facts 2017: an analysis of European plastics production, demand and waste data. Available from: <https://www.plasticseurope.org/en>. Erişim Tarihi: 26.04.2022.
- Poór, P., Ördög, A., Czékus, Z., Borbély, P., Takács, Z., Kovács, J., and Tari, I. (2018). Regulation of the key antioxidant enzymes by developmental processes and environmental stresses in the dark. *Biologia Plantarum*, 62(2), 201-210.
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., and Rocha-Santos, T. (2020). Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of The Total Environment*, 702, 134455.
- Raju, P., Gunabal, S., and Santhanam, P. (2019). The impact of microplastics on marine copepods. In *Basic and Applied Zooplankton Biology* (pp. 429-442). Springer, Singapore.
- Ratcliffe, N. A. (1993). Cellular defense responses of insects: unresolved problems. *Parasites and Pathogens of Insects*, 1, 267-304.
- Ribeiro, C., and Brehélin, M. (2006). Insect haemocytes: what type of cell is that?. *Journal of Insect Physiology*, 52(5), 417-429.
- Richards, E. H., and 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. *Journal of Insect Physiology*, 54(6), 1041-1049.

- Rillig, M. C. (2012). Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil?. *Environmental Science and Technology*, 46, 12, 6453–6454.
- Rizki, T. M., and Rizki, R. M. (1980). Developmental analysis of a temperature-sensitive melanotic tumor mutant in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 189(3), 197-206.
- Rizki, T. M., and Rizki, R. M. (1983). Basement membrane polarizes lectin binding sites of *Drosophila* larval fat body cells. *Nature*, 303(5915), 340-342.
- Rowley, A. F., and Ratcliffe, N. A. (1981). *Invertebrate Blood Cells*. V, 2, 421.
- Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238(4826), 491-497.
- Salt, G. (1968). The resistance of insect parasitoids to the defence reactions of their hosts. *Biological Reviews*, 43(2), 200-232.
- Salt, G. (1970). The cellular defence reactions of insects. *Cambridge University Press*. Vol:16.
- Santillo, D., Miller, K., and Johnston, P. (2017). Microplastics as contaminants in commercially important seafood species. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 516-521.
- Schmidt, O., Theopold, U., and Strand, M. (2001). Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays*, 23(4), 344-351.
- Schmit, A. R., and Ratcliffe, N. A. (1978). The encapsulation of araldite implants and recognition of foreignness in *Clitumnus extradentatus*. *Journal of Insect Physiology*, 24(6-7), 511-521.
- Seltenrich, N. (2015). New link in the food chain? Marine plastic pollution and seafood safety. *Environmental Health Perspectives*, 123(2), A34–A41.
- Sharifinia, M., Bahmanbeigloo, Z. A., Keshavarzifard, M., Khanjani, M. H., and Lyons, B. P. (2020). Microplastic pollution as a grand challenge in marine research: A closer look at their adverse impacts on the immune and reproductive systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204, 111109.

- Shengchen, W., Jing, L., Yujie, Y., Yue, W., and Shiwen, X. (2021). Polystyrene microplastics-induced ROS overproduction disrupts the skeletal muscle regeneration by converting myoblasts into adipocytes. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 125962.
- Shia, A. K., Glittenberg, M., Thompson, G., Weber, A. N., Reichhart, J. M., and Ligoxygakis, P. (2009). Toll-dependent antimicrobial responses in *Drosophila* larval fat body require Spatzle secreted by haemocytes. *Journal of Cell Science*, 122(24), 4505-4515.
- Sideri, M., Tsakas, S., Markoutsas, E., Lampropoulou, M., and Marmaras, V. J. (2008). Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology*, 123(4), 528-537.
- Silva, C. J., Beleza, S., Campos, D., Soares, A. M., Silva, A. L. P., Pestana, J. L., and Gravato, C. (2021). Immune response triggered by the ingestion of polyethylene microplastics in the dipteran larvae *Chironomus riparius*. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125401.
- Singkum, P., Suwanmanee, S., Pumeesat, P., and Luplertlop, N. (2019). A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 66(1), 31-55.
- Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M., and Neff, R. A. (2018). Microplastics in seafood and the implications for human health. *Current Environmental Health Reports*, 5(3), 375-386.
- Srinivasan, R. (2012). Integrating biopesticides in pest management strategies for tropical vegetable production. *Journal of biopesticides*, 5, 36-45
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H., and Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292(5820), 246-248.
- Strand, M. R. (2008a). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Immunology*, 32, 25-47.
- Strand, M. R. (2008b). The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1), 1-14.
- Strand, M. R., and Pech, L. L. (1995). Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*, 40(1), 31-56.

- Strand, M. R., Hayakawa, Y., and Clark, K. D. (2000). Plasmatocyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *Journal of Insect Physiology*, 46(5), 817-824.
- Sugumaran, M., and Kanost, M. R. (1993). Regulation of insect hemolymph phenoloxidasases. *In Parasites and Pathogens of Insects* (pp. 317-342). Academic press.
- Theopold, U., Rissler, M., Fabbri, M., Schmidt, O., and Natori, S. (1999). Insect glycobiology: a lectin multigene family in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(3), 923-927.
- Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W., and Russell, A. E. (2004). Lost at sea: where is all the plastic?. *Science (Washington)*, 304(5672), 838.
- Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, K., and Yokoo, S. (2000). Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 46(7), 1129-1135.
- Toru, Arakava. (1994). Superoxide generation in vitro in lepidopteran larval haemolymph. *Journal of Insect Physiology*, 40(2), 165-171.
- Trifuoggi, M., Pagano, G., Oral, R., Pavičić-Hamer, D., Burić, P., Kovačić, I., and Lyons, D. M. (2019). Microplastic-induced damage in early embryonal development of sea urchin *Sphaerechinus granularis*. *Environmental Research*, 179, 108815.
- Tsai, C. J. Y., Loh, J. M. S., and Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214-229.
- Tsakas, S., and Marmaras, V. J. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7(2), 228-238.
- Tunçsoy, B., Tunçsoy, M., Gomes, T., Sousa, V., Teixeira, M. R., Bebianno, M. J., and Ozalp, P. (2019). Effects of copper oxide nanoparticles on tissue accumulation and antioxidant enzymes of *Galleria mellonella* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102(3), 341-346.
- Uçkan, F., Er, A., and Ergin, E. (2010). Levels of encapsulation and melanization in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized and envenomated by *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Applied Entomology*, 134(9-10), 718-726.

- Umamaheswari, S., Priyadarshinee, S., Kadirvelu, K., and Ramesh, M. (2021). Polystyrene microplastics induce apoptosis via ROS-mediated p53 signaling pathway in zebrafish. *Chemico-Biological Interactions*, 345, 109550.
- Van Aken, O., and Van Breusegem, F. (2015). Licensed to kill: mitochondria, chloroplasts, and cell death. *Trends in Plant Science*, 20(11), 754-766.
- Van Cauwenberghe, L., and Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193, 65-70.
- Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., and Janssen, C. R. (2013). Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental Pollution*, 182, 495-499.
- van Raamsdonk, L. W., van der Zande, M., Koelmans, A. A., Hoogenboom, R. L., Peters, R. J., Groot, M. J., and Weesepeel, Y. J. (2020). Current insights into monitoring, bioaccumulation, and potential health effects of microplastics present in the food chain. *Foods*, 9(1), 72.
- Vickers, N. J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. *Current Biology*, 27(14), R713-R715.
- Vilmos, P., and Kurucz, E. (1998). Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*, 62(2), 59-66.
- Vranová, E., Inzé, D., and Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1227-1236.
- Walkinshaw, C., Lindeque, P. K., Thompson, R., Tolhurst, T., and Cole, M. (2020). Microplastics and seafood: lower trophic organisms at highest risk of contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110066.
- Wan, Z., Wang, C., Zhou, J., Shen, M., Wang, X., Fu, Z., and Jin, Y. (2019). Effects of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism in larval zebrafish. *Chemosphere*, 217, 646-658.
- Wang, W., Gao, H., Jin, S., Li, R., and Na, G. (2019). The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 110-117.

- Wang, X., Zhang, X., Sun, K., Wang, S., and Gong, D. (2022). Polystyrene microplastics induce apoptosis and necroptosis in swine testis cells via ROS/MAPK/HIF1 α pathway. *Environmental Toxicology*, 37(10), 2483-2492.
- Wang, Y., Oberley, L. W., and Murhammer, D. W. (2001). Antioxidant defense systems of two lipidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1254-1262.
- Wigglesworth, V. B. (1937). Wound healing in an insect (*Rhodnius prolixus* Hemiptera). *Journal of Experimental Biology*, 14(3), 364-381.
- Wu, G., and Yi, Y. (2015). Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 167, 131-139.
- Wu, G., Liu, Y., Ding, Y., and Yi, Y. (2016). Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue and Cell*, 48(4), 297-304.
- Wu, H., Guo, J., Yao, Y., and Xu, S. (2022). Polystyrene nanoplastics induced cardiomyocyte apoptosis and myocardial inflammation in carp by promoting ROS production. *Fish and Shellfish Immunology*, 125, 1-8.
- Xiao, Y., Jiang, X., Liao, Y., Zhao, W., Zhao, P., and Li, M. (2020). Adverse physiological and molecular level effects of polystyrene microplastics on freshwater microalgae. *Chemosphere*, 255, 126914.
- Yang, D., Zhu, J., Zhou, X., Pan, D., Nan, S., Yin, R., and Ding, Y. (2022). Polystyrene micro- and nano-particle coexposure injures fetal thalamus by inducing ROS-mediated cell apoptosis. *Environment International*, 166, 107362.
- Yi, Y., Wu, G., Lv, J., and Li, M. (2016). Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* immune response to hemocoel injection of entomopathogenic nematode cuticles. *Parasitology research*, 115(2), 597-608.
- Yoshino, T. P., and Vasta, G. R. (1996). Parasite-invertebrate host immune interactions. *Invertebrate Immune Responses*, 125-167.
- Yount, N. Y., and Yeaman, M. R. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 101(19), 7363-7368.

Zarfl, C., and Matthies, M. (2010). Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic?. *Marine Pollution Bulletin*, 60(10), 1810-1814.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-395.

Zhang, Q., Zhao, Y., Li, J., and Shi, H. (2020). Microplastics in Food: Health Risks. *Microplastics in Terrestrial Environments*, 343–356.

EKLER

EKLER

EK A.1 : Polistirenen mikroplastik sertifikası (Sigma, Almanya)

9/7/2021 Sigma-Aldrich Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH
Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland
Tel: +41 61 750 2511 Fax: +41 61 750 5443

Certificate of Analysis

Product Name:	Micro particles based on polystyrene
Product Number:	size: 1 µm
Batch Number:	89904
Product Brand:	BCCG3418
Molecular Formula:	Sigma
Molecular Mass:	
CAS Number:	
Quality Release Date:	03 SEP 2021

TEST	RESULTS
MEASURING TECHNIQUE	CPS DISC CENTRIFUGE DC 24000
CALIB. MEASURING TECHNIQUE	NIST TRACEABLE, NS-STANDARD SRM 1691 (269 NM +/- 7 NM) SRM 1690 (895 NM +/- 8 NM)
NOMINAL PARTICLE DIAMETER	1.0 UM
CALIBRATED PARTICLE DIAMETER	1.03 UM
STANDARD DEVIATION	0.02 UM
CV	2.4 %
DENSITY D20/4	PARTICLE SPECIFIC GRAVITY: 1.05 G/CM3
SOLID CONTENT	10 %
PARTICLE COMPOSITION	POLYSTYRENE


Dr. Reinhold Schwermer
Quality Assurance
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip. Sigma-Brand products are sold exclusively through Sigma-Aldrich, Inc.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Seranay ÖZGEN

Doğum tarihi ve yeri : 14.07.1996 / Bağcılar

e-posta : serenayturkdogan@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Biyoloji	2020- devam ediyor
Lisans	Çanakkale 18 Mart Üniversitesi/ Biyoloji	2014-2020
Lise	Bağcılar Orhangazi Anadolu Lisesi, İstanbul	2010-2014