



**POLİSTİREN MİKROPARTİKÜLLERİNİN
MODEL BÖCEK TENEBRİO MOLITOR L.
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)'UN LARVAL
EVRESİ ÜZERİNDE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Nurşen ŞİMŞEKATAN

Eskişehir, 2025

**POLİSTİREN MİKROPARTİKÜLLERİNİN MODEL BÖCEK TENEBRİO
MOLITOR L. (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)'UN LARVAL EVRESİ
ÜZERİNDE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ**

Nurşen ŞİMŞEKATAN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Eskişehir 2025

*Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)
tarafından 124Z623 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurşen ŞİMŞEKATAN'ın POLİSTİREN MİKROPARTİKÜLLERİNİN MODEL BÖCEK TENEBRİO MOLITOR L. (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)'UN LARVAL EVRESİ ÜZERİNDE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ başlıklı çalışması 26/05/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvan Adı Soyadı

İmza

Üye

: Prof. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

Üye

: Prof. Dr. Olga SAK

Üye

: Doç. Dr. Volkan KILIÇ

Prof. Dr. Harun BÖCÜK

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

DANIşMAN ONAYI

Danişmanlığını yürüttüğüm Yüksek Lisans ğrencisi Nurşen şİMşEKATAN, POLİSTİREN MİKROPARTİKÜLLERİNİN MODEL BÖCEK TENEBRİO MOLİTOR L. (COLEOPTERA: TENEBRİONİDAE)’UN LARVAL EVRESİ ÜZERİNDE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ başlıklı tez çalışmasını tamamlamıştır. Hazırlamış olduğu tez tarafımca incelenmiş ve öğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez Danişmanı

Prof. Dr. Hülya ALTUNTAş

ÖZET

POLİSTİREN MİKROPARTİKÜLLERİNİN MODEL BÖCEK TENEBRİO MOLİTOR L. (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)'UN LARVAL EVRESİ ÜZERİNDE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ

Nurşen ŞİMŞEKATAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Mayıs 2025

Danışman: Prof. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

Polistiren (PS), yavaş bozunan ve çevrede yaygın olarak mikroplastik (PS-MP, <5 mm) formlarda birikime uğrayan plastik türlerinden biridir. Bu çalışmada 1 µm boyutunda PS-MP'nin farklı dozlarının (5, 10, 20, 40 mg/ml) ön model organizma sarı un kurdu, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) türü üzerindeki immünolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Belirlenen PS-MP dozlarına besin aracılığıyla maruz kalan gruplarda kontrol grubuna kıyasla larval ve pupal yaşam süresinin arttığı, larval, pupal ve ergin ağırlığının azaldığı belirlendi. PS-MP uygulama sonrasında larval hemolenfteki toplam hemosit sayısı, mitotik indeks, plazmatosit, granülosit ve önosit oranlarının dozlara göre değiştiği belirlenirken, prohemosit oranında bir değişiklik gözlenmedi. Yayılan hücre, nekrotik ve anormal hücre oluşum oranları PS-MP dozuna bağlı olarak artarken, apoptotik hücre oranının en yüksek dozda azaldığı belirlendi. Larval hemositlerin enkapsülasyon tepkisi ise kontrole kıyasla azaldı. Larval hemolenfteki toplam protein miktarında önemli bir değişiklik gözlenmezken fenoloksidaz aktivitesinin PS-MP doz artışına bağlı olarak arttığı belirlendi. Comet analiz sonuçlarına göre ise PS-MP dozuna bağlı olarak DNA hasarında artış olduğu tespit edildi. Tez kapsamında elde edilen tüm veriler, düşük boyutlu (1 µm) PS-MP'ye artan dozlarda maruz kalan model ve ekonomik-faydalı böcek *T. molitor* larvalarının doğal bağışıklık savunmasında değişikliğe neden olurken, sitotoksik ve genotoksik etkilerin varlığına işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Polistiren-mikroplastikler, *Tenebrio molitor*, Doğuştan gelen imünite, Genotoksisite, Sitotoksisite

ABSTRACT

IMMUNOLOGICAL EFFECTS OF POLYSTYRENE MICROPARTICLES ON THE LARVAL STAGE OF THE MODEL INSECT *TENEBRIO MOLITOR* L. (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Nurşen ŞİMŞEKATAN

Department of Biology

Programme in Zoology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, May 2025

Supervisor: Prof. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

Polystyrene (PS) is a type of plastic that degrades slowly and accumulates widely in the environment in the form of microplastics (PS-MPs, <5 mm). This study aimed to investigate the immunological effects of different doses (5, 10, 20, 40 mg/ml) of 1 µm PS-MPs on the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), a model organism. Exposure to PS-MPs through the diet resulted in increased larval and pupal developmental times but decreased larval, pupal, and adult weights compared to the control group. PS-MP exposure altered total hemocyte count, mitotic index, and the levels of plasmatocytes, granulocytes, and oenocytoids in larval hemolymph, while prohemocyte rate unchanged. The rate of spreading, necrotic, and abnormal hemocytes increased with an increasing PS-MP dose, whereas the level of apoptotic cells decreased at the highest dose. The encapsulation response of larval hemocytes decreased compared to the control. While no significant change was observed in the total protein content of larval hemolymph, phenoloxidase activity in hemolymph increased with an increasing PS-MP doses. Comet assay results revealed a dose-dependent increase in DNA damage in the larval hemocytes. All data obtained in this study indicate that exposure to low-sized (1 µm) PS-MPs at increasing doses alters the innate immune defense of model and economic insect *T. molitor* larvae, while also causing cytotoxic and genotoxic effects.

Keywords: Polystyrene-microplastics, *Tenebrio molitor*, Innate immunity, Genotoxicity, Cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans çalışma sürecimin başından sonuna kadar bilgi, deneyim ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden değerli danışmanım Prof. Dr. Hülya ALTUNTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. Bu süreçte bana sağladığı tüm desteklerle birlikte her daim teşvik ve motive edici olması, gerçekleştirmiş olduğum tez çalışmasının daha verimli ve anlamlı geçmesini sağlamıştır. Tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 124Z623 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

Deneyisel analizlerimde kullanmış olduğum COMET yönteminde bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan sayın Doç. Dr. Volkan KILIÇ'a ve eğitim sürecimde emeği geçen diğer tüm Zooloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvarında deneylerimin bir kısmında yer alan ve yardımını esirgemeyen sevgili Taylan BENVAN, Ayşe AŞAN ve Elif Nur AŞÇIOĞLU'na da teşekkür ederim.

Son olarak bu süreçte uzakta da olsa her zaman maddi ve manevi destekçim olan sevgili aileme, zorlandığımda bana güç veren ve beni motive eden canım arkadaşım İrem ATAL'a, laboratuvarında geçirdiğimiz kısa sürede tecrübelerini benimle paylaşan Emine DUMAN ERBAŞ'a ve her zaman sevgisini ve manevi desteğini benden esirgemeyen Ömer TOPYILDIZ'a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nurşen ŞİMŞEKATAN

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Nurşen ŞİMŞEKATAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	I
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	II
DANIŞMAN ONAYI.....	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VI
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
GÖRSELLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Polistiren (PS).....	7
1.2. Böceklerde Bağışıklık Sistemi.....	8
1.3. Hücresel Bağışıklık	9
1.4. Humoral Bağışıklık	10
1.5. Model Böcek <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	12
1.5.1. Sistematikteki yeri.....	13
1.6. Amaç ve Hipotez	14
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
2.1. Model Böcek <i>T. molitor</i> Larvalarının Stok ve Süksesif Kültürü	16
2.2. PS-MP Dozlarının ve Deneysel Grupların Belirlenmesi.....	16
2.3. PS-MP Dozlarının <i>T. molitor</i> 'un Biyolojisi ve Gelişimi Üzerindeki Etkisi.....	17
2.4. PS-MP' Dozlarının <i>T. molitor</i> İmmün Sistemi Üzerindeki Etkileri	18

2.4.1. Toplam hemosit sayısı	18
2.4.2. Farklı hemosit sayısı, mitotik indeks ve anormal hücre oluşumlarının belirlenmesi.....	20
2.4.3. Hemosit yayılması	20
2.4.4. Fenoloksidaz aktivite tayini	21
2.4.4.1. <i>Total protein tayini</i>	21
2.4.5. Enkapsülasyon.....	22
2.4.6. Comet analizi (tek hücre jel elektroforezi) ile DNA hasarının belirlenmesi	23
2.5. İstatistiksel Analiz.....	24
3. BULGULAR.....	25
3.1. PS-MP Dozlarının <i>T. molitor</i> Biyolojisi ve Gelişimi Üzerine Etkisi.....	25
3.2. Toplam Hemosit Sayısı	26
3.3. Farklı Hemosit Sayısı, Mitotik İndeks ve Anormal Hücre Oluşumları	27
3.4. Hemosit Yayılması	31
3.5. Fenoloksidaz Enzim Aktivitesi	32
3.6. Enkapsülasyon	34
3.7. Genotoksisite	35
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	38
KAYNAKÇA	52
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. PS-MP'lerine besin yoluyla maruz kalan T. molitor larvalarının gelişim biyolojisinde meydana gelen değişimler	25
Tablo 3.2. Artan dozda PS-MP'leri ile beslenen T. molitor larvalarının büyüme ve beslenme performansındaki değişimler.....	26
Tablo 3.3. Artan dozlarda PS-MP dozlarıyla beslenen T. molitor larvalar hemositlerindeki apoptotik, nekrotik ve anormal hücre oranları	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Polistirenin kimyasal formülü (http-1)	7
Şekil 1.2. T. molitor gelişim evreleri (a ₁ : küçük instar larva, a ₂ : yeni deri değiştirmiş larva, a ₃ : son instar larva; b ₁ : yeni pupa, b ₂ : pupa; c ₁ : yeni ergin, c ₂ -c ₃ : genç ergin, c ₄ : yetişkin ergin)	13
Şekil 2.1. Farklı dozlarda PS-MP eklenen larval besin grupları ve gelişim biyolojisi deney düzeneği	18
Şekil 2.2. Neubauer hemosimetre	19
Şekil 2.3. Neubauer hemositometresi sayım alanı	19
Şekil 3.1. PS artan dozlarının T. molitor larvalarının toplam hemosit sayısına etkisi	27
Şekil 3.2. Artan PS-MP dozlarının (5-40 mg/ml) larval hemosit tiplerinin oranında ve mitotik indeks üzerindeki etkileri	28
Şekil 3.3. PS-MP dozlarının T. molitor larval hemositlerinin yayılma davranışlarında meydana getirdiği değişimler	32
Şekil 3.4. PS-MP artan dozlarının T. molitor larval protein miktarı üzerindeki etkisi	33
Şekil 3.5. PS-MP dozlarının T. molitor larval hemolenfindeki Fenoloksidaz (FO) aktivitesi üzerindeki etkileri.....	34
Şekil 3.6. PS-MP'lerine maruz bırakılan T. molitor larval hemositlerinin enkapsülasyon indeksi (%)	35
Şekil 3.7. PS-MP'lerinin farklı dozlarının T. molitor larval hemositlerindeki Comet parametrelerine etkisi	37

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 1.1. Tenebrio molitor larva	14
Görsel 3.1. T. molitor’da Giemsa boyama yöntemi ile tespit edilen hemosit çeşitleri (a: prohemosit, b: granülosit, c: plazmatosit, d: önositoid) (ölçek: 10 µm, x100 büyütme).....	29
Görsel 3.2. T. molitor larvalarında mitoz bölünme evresinde olan hemositler (a-b, ölçek: 30 µm, x40 büyütme; c, ölçek: 10 µm, x100 büyütme).....	29
Görsel 3.3. PS-MP’lerine besin yoluyla maruz kalan T. molitor larval hemositlerinde tespit edilen dev çok çekirdekli hücreler (a-c), karyoreksis (d-f) ve mikronükleus oluşumu (g-ı) (ölçek: 10 µm, x100 büyütme).....	30
Görsel 3.4. PS-MP’lerine besin yoluyla maruz kalan T. molitor larval hemositlerinde tespit edilen apoptoz (a-b), erken apoptoz (c-d) ve nekroz (e-f) evreleri (ölçek: 10 µm, x100 büyütme).....	31
Görsel 3.5. T. molitor larval hemolenfinde yayılış gösteren hemositlerin mikroskopik görüntüleri (ölçek: 10 µm; x100 büyütme)	32
Görsel 3.6. Besinsel yolla PS-MP’ye maruz bırakılan T. molitor larval hemositlerinde belirlenen enkapsülasyon durumlarının faz-kontrast mikroskobu görüntüleri (Leica DM6000 B, x10 büyütme) (ölçek çubuğu=100 µm). 0: enkapsülasyon yok; 1-2-3: zayıf enkapsülasyon; 4-5: güçlü enkapsülasyon	35
Görsel 3.7. COMET analizine ait SYBR Green ile boyanmış T. molitor larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri (Leica DM6000 B, x40 büyütme) (ölçek çubuğu=30 µm). (a-b): DNA hasarı olmayan hemositler; (c-d): DNA hasarı olan hemositler.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µm	: Mikrometre
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
g	: Gram
n	: Örneklem sayısı
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
x	: Çarpı
MP	: Mikroplastik
NP	: Nanoplastik
PS	: Polistiren
PE	: Polietilen
PP	: Polipropilen
PU	: Poliüretan
PET	: Polietilen tereftalat
PVC	: Polivinil klorür

1. GİRİŞ

Plastik atıkların günümüzde büyük ölçekteki üretimi, bilinçsizce tüketilmesi ve çeşitli ekosistemlerde birikmesi, dünya genelinde büyük bir çevre sorunu haline gelmiştir. Plastiklerin zaman içerisinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik yollarla küçük parçalara ayrılarak mikroplastik (MP) olarak adlandırılan formlarda bulunması ile plastikler bir ekosistemden diğerine kolaylıkla yayılmaya başladı. Bu durum insan, hayvan ve bitkilerin sürekli olarak plastiklere ve MP'lere maruz kalmasına yol açtı. MP'ler zararsız gibi görünmesinin aksine yapılarında dayanıklılıklarını arttıran birçok toksik kimyasal bulundurmalarının yanı sıra ağır metaller gibi maddeleri de taşıyabilmektedir. Bu özellikleri ile canlı vücuduna giren ve küçük boyutları ile doku ve organlarda birikebilen MP'ler metabolik bozukluklara neden olmakla birlikte immünolojik, nörolojik, mutajenik ve kanserojenik etkileri de beraberinde getirmektedir.

Endüstriyel ölçekte plastik üretiminin başladığı 1950'li yıllardan günümüze kadar 8,3 milyon tondan fazla plastik üretildiği ve bu miktarın yaklaşık dörtte üçünün atık olarak çevrede biriktiği bildirildi (Waring vd., 2018). Dünya genelinde 2022 yılında üretilen plastik miktarı 400 milyon tonu geçmiş ve bu sayının sadece %10'unun geri dönüştürülebildiği bilinmektedir (PlasticsEurope, 2023). Plastikler, doğal gaz ve ham petrolde bulunan hidrokarbonlardan elde edilen yüksek molekül ağırlıklı sentetik organik polimerler olmakla birlikte temelde ikiye ayrılır: yüksek ve düşük yoğunluklu PE (polietilen), PP (polipropilen), PS (polistiren), PVC (polivinil klorür) ve PET (polietilen tereftalat) gibi ısı ile şekillendirilebilen termoplastikler; PUR (poliüretan) gibi ısı ile şekillendirilip kalıba sokulamayan termosetler (Geyer vd., 2017; Rhodes, 2018). Son zamanlarda yapılan araştırmalar ve çalışmalarda plastik kirliliği, plastik boyutuna göre: nanoplastikler (1 ila <1000 nm), mikroplastikler (1 ila <1000 µm), mezoplastikler (1 ila <10 mm), makroplastikler (1 cm'den büyük parçalar) olarak değerlendirilmektedir (Rhodes, 2018; Hartmann vd., 2019; Wu vd., 2019).

MP'ler çevre kirliliği sorununun yeni bir boyutunu temsil ederek havaya, suya ve toprağa karışarak gıda ve içeceklere buradan da dolaylı ya da doğrudan yollarla canlı vücuduna girebilmektedir (Yurtsever, 2018; WHO, 2019). MP kirliliği birincil ve ikincil olarak iki kategoride değerlendirilir. Birincil MP'ler, 5 mm'den küçük olan ve doğrudan çevrede biriken plastikler olup kozmetik, boya ve ambalaj malzemelerinden oluşur. İkincil MP'ler ise büyük boyutlu plastiklerin fiziksel ve kimyasal etkilerle daha küçük parçalara ayrışmasıyla meydana gelir (Lett vd., 2021).

MP'lere dayanıklılık ve alev geciktirici gibi özelliklerini değiştirmek için bazı katkı maddeleri (Bisfenol A, ftalatlar, polibromlu difenil eterler ve metaller gibi) eklenmektedir (Verma vd., 2016; Revel vd., 2018). Ayrıca MP'ler kimyasal yapıları nedeniyle çevrede bulunan toksik maddeleri ve ağır metalleri absorbe ederek taşıma özelliğine sahiptir (Revel vd., 2018; Yurtsever, 2018; Kasmuri vd., 2022). Bu özellikleriyle çeşitli yollardan canlı bünyeye giren MP partiküller insan ve hayvan sağlığı için tehlike oluşturur. Yapılan çalışmalarda eşyaların üzerinde biriken toz partiküller de olmak üzere iç ve dış mekan atmosferinde MP kalıntıların bulunduğu ve bu partiküllerin atmosferik olarak taşındığı rapor edildi (Gasperi vd., 2015; Dris vd., 2017; Kaya vd., 2018; Shiridharan vd., 2021; Xie vd., 2022). Nesnelerin üzerindeki tozlarda biriken MP partiküller hava sirkülasyonu ile taşınarak solunum yoluyla insan vücuduna girebilmektedir. Bu çalışma mikro boyuttaki plastiklerin aslında ne kadar kolay taşınabildiğini ve bu plastiklere sık sık maruz kalındığını göstermektedir.

MP'ler en yaygın olarak sucul ekosistemlerde görülmekle birlikte burada yaşayan canlı organizmalar tarafından yutulabilmekte ve doğrudan veya dolaylı yoldan insan ve diğer hayvanların besin zincirine karışarak vücutta toksik etkilere neden olabilmektedir (Jiang vd., 2022). Su sistemlerine (okyanus, deniz, nehir vb.) karışan MP'lerin, balıkların çeşitli dokularına nüfuz ederek bu dokularda biriktiği ve farklı dokulara geçerek balık fizyolojisinde toksik etkilere neden olduğu belirtildi (Wang vd., 2020). *Danio regio* (zebra balığı)'un farklı yaşam formları (embriyo, larva ve yetişkin) ve yaygın görülen plastiklerin (PS, PE, PP, PVC) nanoplastik (<1 µm) ve mikroplastik (1 µm-5 mm) boyutları ile yapılan çalışmalarda bu partiküllere maruz kalan balıklarda çeşitli toksik etkilerin yanında ağırlıklı olarak MP'lerden kaynaklı immünotoksik (Lu vd., 2016; Veneman vd., 2017), genotoksik (Lu vd., 2016; Mak vd., 2019), oksidatif stres (Lu vd., 2016; Z. Wan vd., 2019; Umamahesvari vd., 2021), bağırsak hasarı (Lei vd., 2018; Limonta vd., 2019) ve metabolizmal (Lu vd., 2016; Z. Wan vd., 2019; Zhao vd., 2021) etkiler meydana geldiği rapor edildi (Bhagat vd., 2020).

Toprakta bulunan atık plastiklerin aşınmasıyla ortaya çıkan MP'ler toprağın su tutma kapasitesi ve pH değeri gibi fiziko-kimyasal özelliklerini ve toprak mikroorganizmalarını etkileyerek biyolojik özelliklerini değiştirmektedir (Xiang vd., 2022). Buradaki MP'lerin bitkilerin toprak üstü ve toprak altı üretkenliklerini ve topraktaki suyun buharlaşma hızını artırarak su kaybını etkilediği belirtildi (Y. Wan vd., 2019; Zang vd., 2020). Toprağa karışan plastiklerin neden olduğu bu olumsuz etkiler

tarımsal ürünlerin verimsizleşmesine ve dolaylı yoldan besin zincirine karışarak canlı vücuduna geçmesine neden olabilir. Ayrıca toprakta bulunan MP'lerin böcek, solucan ve salyangoz gibi karasal omurgasızların dokularında birikime uğramasıyla çeşitli fizyolojik ve metabolik sorunlara neden olabileceği de rapor edildi (Al-Jaibach vd., 2018; Rodriguez-Seijo vd., 2018; Selonon vd., 2020; Sanchez-Hernandez, 2021; Turna vd., 2022).

MP'lerin çevrede oluşturduğu kirlilik ve canlı ekosistemdeki olumsuz etkileri göz önüne alındığında plastiklerin doğada yok edilmesi ve geri dönüşümü için hem kimyasal hem de biyolojik yöntemlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar giderek arttı. Doğal olarak yok edilemeyen plastiklerin ortadan kaldırılması piroliz gibi ısı gerektiren işlemler ile bir dizi kimyasal reaksiyon süreçlerini içerir (Geyer vd., 2017). Bu işlemler sonuçta ortaya birçok toksik gaz ve yan ürünlerin çıktığı zaman alıcı ve maliyetli işlemlerdir. Diğer yandan plastiklerin biyolojik yöntemlerle ayrıştırılması hem ekonomik hem de çevre dostu olan süreçleri kapsar (Zheng vd., 2008; Li vd., 2023).

Biyodegradasyon, plastikler gibi uzun süre doğada kalan organik maddelerin bakteri ve mantarlar gibi mikroorganizmalar tarafından ayrıştırılma süreci olarak ifade edilir (Shah vd., 2008). Mikrobiyal parçalanma süreci temelde bir dizi enzimatik ve hidrolitik yol ile gerçekleşir. Bu süreç MP'lerin fizikokimyasal yapısının değişmesiyle başlayıp daha küçük molekül ağırlıklı oligomerlere ve en sonunda da metabolitlere (CO₂, H₂O ve CH₄) dönüşmesiyle sonlanır (Li vd., 2023). Biyodegradasyon süreci, plastiklerin kimyasal özelliklerine, mikroorganizmaların türüne ve metabolik aktivitelerine göre değişiklik gösterebilmektedir (Artham ve Doble, 2008; Bahl vd., 2021). Ancak, mikroorganizmaların plastik ayrışmasında zayıf performans göstermesi, bilinmeyen ara ürünler, ayrışmada temel rol oynayan anahtar genlerin ve enzimlerin bilinmemesi gibi nedenler araştırmacıları alternatif yollar aramaya itti (He ve Luo, 2020).

Plastivor (plastik yiyen) olarak adlandırılan bazı karasal böcek türlerinin PP (polipropilen), PE (polietilen), PS (polistiren), PVC (polivinil klorür) ve PU (poliüretan) gibi yaygın kullanılan plastikleri biyodegradasyona uğrattığı belirlendi (Yang vd., 2018a; He ve Luo, 2020; Jiang vd., 2021; Orts vd., 2022; Elmekawy vd., 2023; Peng vd., 2023). Bu özelliğe sahip böcekler arasında yer alan *Tenebrio molitor*'un (Coleoptera: Tenebrionidae) farklı plastik türlerini sindirebildiği ve bağırsak bakterileri aracılığı ile önce depolimerize daha sonra mineralize ederek ortaya çıkan ürünlerin (karbondioksit, su) bir kısmını biokütleyle dahil ettiği bir kısmını da dışkı yoluyla vücuttan uzaklaştırdığı

yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Yang vd., 2015a; Yang vd., 2015b ; Yang vd., 2018a; He ve Luo, 2020; Putra ve Nurcahyasari, 2021; Machona vd., 2022; Peng vd., 2023; Di Liberto vd., 2024).

T. molitor gibi plastik yiyen böceklerin bağırsağında plastik biyodegradasyonunda rol oynayan mikrobiyal metabolizmanın araştırılması üzerine literatürde çok sayıda çalışma yer almaktadır. Yang vd. (2015a) yaptıkları çalışmada un kurtlarının strafor formdaki PS'i 24 saatten daha kısa bir sürede tükettiklerini gözlemlemiştir. Straforla beslenen larvalardan toplanan dışkı örnekleri jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), katı hal ¹³C spektroskopisi (CP/MAS NMR) ve kızılötesi spektroskopisi (TG-FTIR) kullanılarak analiz edilmiş ve uzun zincirli PS polimerlerinin depolimerizasyonunun larva bağırsağında meydana geldiği kanıtlanmıştır. Yutulan straforun %47,7'si CO₂'ye dönüştürülerek, yaklaşık %0,5'i biyokütleyle dahil edilmiş ve %49,2'si de dışkı-kalıntı olarak vücuttan atılmıştır. Aynı çalışmanın ikinci kısmında ise PS'in biyodegradasyonunda bağırsak mikrobiyotasının temel rol oynadığı belirtilmiştir (Yang vd., 2015b). PS yedirilen larvalar 10 gün boyunca gentamisin antibiyotiği ile beslenmiş ve larva dışkıları analiz edilmiştir. Sonuç olarak gentamisin verilen larvalarda PS depolimerizasyonunun ve CO₂'ye dönüşümünün inhibe edildiği görülmüştür. Un kurtlarının bağırsağından PS'i parçalayabilen bir bakteri olan *Exiguobacterium* sp. YT2 suşu izole edilmiştir. Putra ve Nurcahyasari (2021)'nin yaptıkları çalışmada ise *T. molitor* larvalarına PS yapıda olan gıda ambalajı, elektronik ambalaj, buz kutusu ve duvar malzemesi yedirerek larvalardaki ağırlık artışı, uzunluk artışı, ürünlerin bozunma hızı ve atık azaltma indeksi (WRI) değerleri incelenmiştir. Sonuçlar en yüksek ortalama uzunluk artışının (1,69 cm) PS duvar malzemesi tüketenlerde, en yüksek WRI değerinin ise PS duvar malzemesi ve elektronik ambalaj tüketenlerde olduğunu göstermiştir. Daha önce yapılan bu ve bunun gibi çalışmalarla *T. molitor* lavalalarının plastik atıklarını yeme özelliğine sahip olduğu ve çeşitli plastik atıklarının azaltılmasına katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir (Yang vd., 2015b; Yang vd., 2018a; Bulak v., 2021; Jiang, S. vd., 2021; Machona vd., 2022; Peng vd., 2023). Ancak MP maruziyetinin immünotoksisite veya sitotoksisitesinin olup olmadığının belirlenmesine yönelik araştırmalar oldukça kısıtlıdır.

Plastiklerin depolimerizasyonu ile oluşan mikro veya nanopartiküllerinin boyutuna ve doza bağlı olarak böcek larvalarının bağırsak lümeninden geçerek, malpighi tüplerine, vücut boşluğuna ve açık dolaşıma katılması söz konusu olabilir (Al-Jaibach vd., 2018; Turna vd., 2022). PS-MP'lere maruz kalan *Culex* cinsi sivrisineklerin beslenen larva

evresinden beslenmeyen pupa evresine ve ardından karasal ortamda yaşayan yetişkin evresine ontogenik olarak aktarılabildiği gösterilmiştir. Ancak, bu aktarımın parçacık boyutuna bağlı olarak gerçekleştiği ve daha küçük 2 µm MP'ler pupa ve ergin evrelerine kolayca aktarılırken, 15 µm MP'ler önemli ölçüde daha düşük bir oranda geçiş yaptığı bildirilmiştir. Özellikle bu partiküllerin bağırsaktan malpighi tübülllerinde birikiminin olduğu da araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Al-Jaibach vd., 2018). *Bombyx mori* (ipek böceği) ile yapılan bir çalışmada ise besin yoluyla PS-NP (0,5 µm)'lerine maruz bırakılan larvaların deney sonunda bağırsak lümeninde, orta bağırsak epitelinde, malpighi tübülllerinde ve dahası hemositlerde PS-NP'lerine rastladıkları bildirilmiştir (Parenti vd., 2020). Turna vd., (2022)'nin yaptıkları çalışmada da besinle birlikte 4, 10, ve 20 µm boyutlarındaki PS-MP'nin çeşitli dozlarına maruz kalan *Drosophila melanogaster* larvalarının bağırsak bariyerinden mikropplastiklerin denenilen boyutlarının geçebildiği ve hemolenfe ulaşabildiği gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada PS-MP'lere (4, 10 ve 20 µm) maruz kalma, uygulanan en yüksek konsantrasyonda (10 mM), %36, %32 ve %30 oranında daha fazla bağırsak hasarına neden olduğu belirtilmiştir (Turna vd., 2022). Hemolenfe kadar ulaşabilecek bu yabancı plastik partiküllerin böceğin hemolenfinde ve dokularında rol oynayan doğal bağışıklık sistemiyle ilişkili faktörler üzerinde meydana getireceği etkilerle ilişkili bilgiler ise kısıtlıdır. MP'lerin olası ekotoksik ve genotoksik etkilerinin başlıca oksidatif stresle, inflamatuvar reaksiyonlarla, DNA hasarıyla ve metabolizmada değişikliklerle ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda ileri sürülmüştür (Chang vd., 2020; Turna vd., 2022). MP ve nanoplastik (NP) toksisitesi ile ilgili daha önce yapılan çalışmalar çoğunlukla sucul canlılar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Lu vd. (2016) yaptıkları çalışmada, PS-MP'lerinin *Danio regio* (zebra balığı) üzerindeki toksik etkilerini araştırmışlardır. *D. regio* 7 gün boyunca PS-MP'lerine (5 µm ve 20 µm) maruz bırakılmış ve bu MP'lerin balığın solungaç, bağırsak ve karaciğer dokularında biriktiği görülmüştür. Uygulanan boyutlardaki PS-MP'lerini oksidatif stresi tetiklediği ve karaciğerde olumsuz etkilere neden olarak lipid ve enerji metabolizmasını bozduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada bir midye türü olan *Scrobicularia plana*'da 20 µm çapındaki PS-MP'nin solungaçlar ve sindirim bezinde birikime uğradığı, antioksidan kapasite, DNA hasarı, nörotoksisite ve oksidatif hasar gibi etkilere neden olduğu gösterilmiştir (Ribeiro vd., 2017). Karasal böcek ve aynı zamanda model organizma olan *D. melanogaster* larvalarında ise, PS-MP'lere (4, 10 ve 20 µm) besin yoluyla maruz kalma, boyuta ve doza bağlı olarak larval hemositlerinde (serbest radikal oksijen

seviyesinin) ROS üretimini artırdığı ve en yüksek dozlarda (5 ve 10 mM) önemli seviyelere ulaştığı belirlenmiştir. Özellikle ROS üretiminin, daha büyük boyutta olanlara (10 ve 20 µm) kıyasla, daha küçük parçacıklara (4 µm) maruz kaldıktan sonra çok daha yüksek olduğu, bu da PS-MP'lerin boyutu küçüldükçe larvalarda oksidatif stresin daha fazla tetiklendiği yönünde yorumlanmıştır (Turna vd., 2022). İnsan serebral (T98G) ve epitelyal (HeLa) hücrelerinin 10 ng/mL'den 10 µg/mL'ye kadar farklı dozlarda metal oksit ve karbon bazlı NP'ler ile PE (3-16 µm)-PS (10 µm) MP'lerine maruz bırakıldığı bir çalışmada ise, yüksek ROS seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar çalışma sonuçlarını oksidatif stresin hücre düzeyinde meydana gelen toksisiteden sorumlu olduğu ve MP'lerin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceği yönünde yorumlamışlardır (Schirinzi vd., 2017).

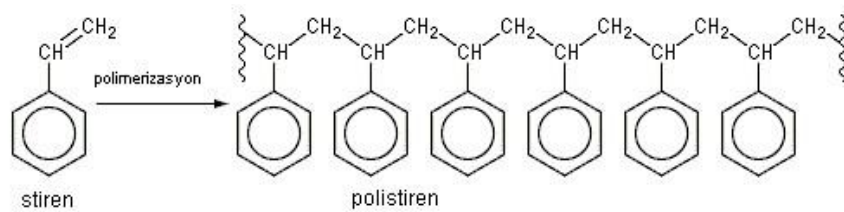
Canlılarda çevresel kimyasallara bağlı ortaya çıkan DNA hasar seviyesinin belirlenmesine yönelik genotoksisite analizleri de önemli bir kriterdir (Olive and Banath, 2006; Azqueta ve Dusinska, 2015). Çünkü organizmalar genotoksik bir ajana maruz kaldığında tek hücredeki DNA hasarı ya da DNA kırılması olarak bilinen değişimler ortaya çıkabilir. Bu nedenle böceklerde birçok kimyasalın genotoksik, mutajenik ve kanserojenik özelliklerinin belirlenmesi için Comet tekniği kullanılarak analiz edilmiştir (Duman ve Altuntaş, 2018; Gwokyalı ve Altuntaş, 2019). Farklı dozlarda ve boyutlardaki MP'lere maruz kalan çeşitli sucul organizmalarda ve memeli hücrelerinde genotoksik etkilerin meydana geldiği ve özellikle doza bağlı olarak DNA hasarında artış olduğu bildirilmiştir (Avio vd., 2015; Berber, 2018; Katsumiti vd., 2021; Nugnes vd., 2022; Babonaite vd., 2023; Moller ve Roursgaard, 2023). Tatlı su organizmalarıyla (*Raphidocelis subcapitata*, *Brachionus calyciflorus*, *Ceriodaphnia dubia*) yapılan bir çalışmada 1 µm boyutundaki PS mikroplastiklerine (PS-MP) maruz kalan organizmalarda bir genotoksisite göstergesi olan DNA hasarıyla birlikte kronik toksisite meydana gelmiştir (Nugnes vd., 2022). Martin-Folgar vd. (2024)'nin yaptıkları çalışmada ise model böcek olan *Chironomus riparius* larvaları çevrede bulunan boyut ve dozlardaki PS nanoplastiklerine (PS-NP) 24 saat maruz bırakmış ve sonuçta PS-NP'nin larvalarda DNA hasarında artışa, hücresel stres ve endokrin sistem üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu görülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada farklı boyutlardaki PS-MP'lere (4, 10 ve 20 µm) besin yoluyla maruz kalan *D. melanogaster* larvalarından elde edilen hemositlerde, test edilen yüksek konsantrasyonlarda (5 ve 10 mM) DNA hasarı seviyelerinde önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm boyutlarda görülen PS-

MP genotoksisitesine rağmen, daha küçük parçacıklara (4 µm) maruz kalmanın daha fazla DNA hasarına neden olduğu da çalışmada belirtilmiştir (Turna vd., 2022). Omurgasız örneklerin yanı sıra atmosferde bulunan farklı boyutlardaki (2 µm-80 nm arasında) PS-MP'lerinin insan akciğer hücrelerinde birikmesiyle önemli ölçüde sitotoksik ve genotoksik etkilere neden olabileceği rapor edilmiştir (Shi vd., 2021).

Daha önce yapılan bu çalışmalar farklı boyutlardaki ve dozlardaki PS ve benzeri MP'lerin farklı seviyedeki organizmaların vücudunda birikime uğrayabileceğine, doku hasarına, sito- ve genotoksik etkiler ile çeşitli fizyolojik değişikliklere neden olabilecek potansiyele sahip olduklarına işaret etmektedir.

1.1. Polistiren (PS)

Şekil 1.1'de gösterilen PS, vinil benzen olarak da bilinen çok sayıda "stiren" monomerlerinin bir araya gelmesiyle oluşan sentetik bir hidrokarbon polimeridir (Pilevar vd., 2019; Krueger vd., 2015; McKen W. L., 2008). Hammadde olarak nispeten ucuz, buharlaşmaya karşı dirençli ve düşük erime noktasına sahiptir (Ho vd., 2018). PS'in ticari kullanım formları: yalıtım, elektronik malzeme ve paketlemede strofor olarak da adlandırılan genişletilmiş polistiren (EPS); kahve fincanları, tepsiler ve ısı yalıtımında ekstrüde polistiren (XPS); saklama kapları ve oyuncaklarda yüksek yoğunluklu polistiren (HIPS) olarak temelde üç tiptir (Yang ve Wu., 2020). PS'in hazır yemek paketlemesinde kullanımı gıda endüstrisinde yaygın olarak yer almasını sağlar. Bu da günlük hayatta yaygın sık ve ihtiyaca bağlı üretiminin artmasına neden olmaktadır.



Şekil 1.1. Polistirenin kimyasal formülü (<http-1>)

PS, ısı ile şekillendirilip sert ve dayanıklı hale getirilebildiği için termoplastikler grubunda yer alır. Bu özelliği sayesinde hidrofobik karakterde olan PS, hidrolize olmaya ve doğal olarak parçalanmaya karşı dayanıklıdır (Ho vd., 2018; Putra ve Nurcahyasari, 2021). Bu durum toprakta bulunan mikroorganizmaların hücre dışı ve hücre içi enzimatik faaliyetlerini gerçekleştirmesini zorlaştırarak bu plastiğin doğada biyolojik olarak bozunmasını yavaşlatır (Ho vd., 2018). Otake vd. (1995), PS gibi hidrofobik özellikte

olan plastiklerin toprağın içine gömülmesinin 30 ila 40 yıla kadar sürdüğünü rapor etmiştir. Buradan yola çıkarak biyodegradasyon süreci de göz önüne alındığında plastiklerin doğada yok olmasının çok uzun yıllar sürdüğü ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle biriken PS atıkları çeşitli ekosistemlere karışarak önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir.

Topraktaki PS ayrışmasının yavaş gerçekleşmesi, parçalanma sırasında ortaya çıkan daha küçük boyutlu PS-MP'lerinin oluşmasına ve bu mikroplastiklerin kolayca çevre ekosistemlere yayılmasını sağlar. Ortamda bulunan PS-MP'lerin burada yaşayan canlılar üzerinde immünotoksik, ekotoksik, nörotoksik ve oksidatif stres etkilere neden olmasının yanı sıra çeşitli dokularda birikerek özellikle metabolik değişimlere sebep olduğu belirtilmiştir (Siddiqui vd., 2023).

1.2. Böceklerde Bağışıklık Sistemi

Hayvanlarda bağışıklık sistemi doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık olarak iki şekilde bulunur. Doğuştan gelen bağışıklık, patojene karşı spesifik olmayan ve eşey hücrelerinde kodlanmış olan faktörlerden oluşurken; kazanılmış bağışıklık, patojene özgü olarak gerçekleştirilen antijen-antikor ilişkisini ve immünolojik bir hafızayı içerir (Strand, 2008; Hillyer, 2016). Bu bağışıklık sistemleri hayvanın türüne, çevre koşullarına ve fizyolojisine göre değişiklik gösterebilmektedir. Kazanılmış bağışıklık böcekler gibi omurgasız hayvanlarda bulunmasa da doğuştan gelen bağışıklık hem omurgalıları hem de omurgasız hayvanlarda ortaktır. Böcek bağışıklığında yer alan hemositler memeli nötrofilleri ile benzer özelliklere sahiptir (Kavanagh ve Reeves, 2007; Sanchez-Hernandez, 2021; Ali vd., 2020). *G. mellonella*'nın bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaları fagosite edebildiğini rapor eden bir çalışmada böcek hemositleri ve insan nötrofillerinin fagositoz mekanizmasında yer alan moleküllerin benzer görevler üstlendiği ifade edilmiştir (Kavanagh ve Reeves, 2007).

Böcekler patojenlerden, parazitlerden ve vücutlarına giren yabancı maddelerden korunmak için doğuştan gelen güçlü bir bağışıklık mekanizması geliştirdiler. Vücuda giren patojen veya yabancı bir maddenin tehlike olarak görülmesi bağışıklık hücreleri (hemositler) ve dokuları (yağ, orta bağırsak) tarafından oluşturulan savunma sistemlerini aktifleştirir (Hillyer, 2016). Sahip olunan bağışıklık mekanizması hücresel ve humoral savunma sisteminin kombinasyonundan oluşur. Bu iki savunma sistemi ayrı sistemler olarak değerlendirilse de temel olarak böcek hemolenfinde (hemocoel) bulunan hemositler her iki tarafta da etkili bir faktördür (Tsakas ve Marmaras, 2010). Ayrıca

hemositler bulundukları yere göre de dolaşımdaki serbest hücreler veya dokulardaki sesil hücreler olarak ifade edilmektedir (Hillyer, 2016).

1.3. Hücresel Bağışıklık

Böceklerde hücresel bağışıklık mekanizması, hemositler tarafından gerçekleştirilen fagositoz (yabancı maddelerin yutularak sindirilmesi), enkapsülasyon (yabancı maddelerin ve patojenlerin kapsül içerisine alınarak melanizasyon süreci ile öldürülmesi) ve nodülasyon olaylarını kapsar. Böcek hemositleri morfolojik, fonksiyonel ve dolaşımda bulunma sıklığı açısından farklılık gösterebilir. *Tenebrio molitor* gibi Coleoptera (kın kanatlılar) takımındaki böceklerin larval hemolenfinde temel olarak granülosit (%50-60), plazmatosit (%23-28), önositoid (%1-2) ve prohemosit (%10-15) olmak üzere dört çeşit hemosit tipi karakterize edilmiştir (Rasmussen, 2014; Urbanski vd., 2018; Vigneron vd., 2019; Vommaro vd., 2021; Wang vd., 2024).

Prohemositler, bağışıklıktaki görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte diğer hücrelere farklılaşan kök hücreler olarak tanımlanırlar. Sitoplazması çekirdeğe oranla az ve oval şeklinde olan aktif mitotik hücrelerdir (Lavine ve Strand, 2002; Strand, 2008; Vigneron vd., 2019).

Granülositler sitoplazması granüllü, oval şekilli ve temelde fagositozda görev alan hemositlerdir. Bu hücreler kapsüllenme başlamadan önce yabancı maddeyle temas eden ilk hücrelerden biridir (Lavine ve Strand, 2002; Chung ve Moon, 2004; Rasmussen, 2014; Vigneron vd., 2019).

Plazmatositler, granülositlerle birlikte fagositozda görev alan, yabancı maddeleri ve patojenleri kapsül içine alarak nodül meydana getiren hücrelerdir. Bu özellikleriyle temelde kapsüllenme görevini üstlenerek granülositlerle birlikte iş birliği içinde oldukları rapor edilmiştir. Morfolojik olarak iğ, oval veya yıldız şeklinde görülürler (Lavine ve Strand, 2002; Rasmussen, 2014; Vigneron vd., 2019).

Önositoidlerin, profenoloksidaz enziminin salgılanmasında ve böylece bağışıklıkta önemli bir unsur olan melanizasyon sürecinde rol oynadığı bilinmektedir. Morfolojik olarak diğer hemositlerden büyük, oval ve granülsüz sitoplazmaya sahiptir (Lavine ve Strand, 2002; Rasmussen, 2014; Urbanski vd., 2018; Vigneron vd., 2019).

Hücresel immün tepkilerin oluşmasında rol oynayan, morfolojik ve fonksiyonel açıdan farklılıklar gösteren hemositlerin hemolenfteki miktarı ve çeşidi, böceğin fizyolojisini etkileyen çevresel kirleticilere bağlı değişimler gösterir (Elmekawy vd.,

2023). Böylece organizmanın immün yanıtının gücü ve yeni koşullara sağladığı fizyolojik adaptasyonuna yönelik mekanizmalar devreye girer (Vigneron vd., 2019). *T. molitor* gibi plastivor böcek olan *Galleria mellonella* (bal mumu güvesi) üzerinde yapılan bir çalışmada, MP boyutunda olmayan düşük yoğunluklu polietilen (LDPE)'den oluşan ambalaj paketi ile beslenen *G. mellonella* larvalarının toplam ve farklı hemosit sayılarında azalma olduğu belirlenmiştir (Elmekawy vd. 2023). 500 ng PET ve 500 ng PS MP'lerine maruz bırakılan *Partamona helleri* (iğnesiz arı) larvalarında ise toplam hemosit sayısının PS yedirilen larvalarda azaldığı ve her iki mikropластиğin de plazmatosit hücrelerinin sayısında azalmaya neden olduğu belirlenerek bu değişikliklerin hücresel bağışıklık tepkisinin bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (Viana vd., 2023). MP'lerin karasal organizmalar üzerindeki etkilerini incelemek isteyen başka bir çalışmada *Drosophila melanogaster* (sirke sineği) farklı dozlarda ve 2 µm çapındaki PS-MP'lerine maruz bırakılmıştır. Bu çalışma sonucunda PS-MP'lerinin doza bağlı olarak sineğin farklı dokularında birikebildiği ve orta bağırsak hücrelerinde apoptotik ve nekrotik etkilere sebep olduğu rapor edilerek karasal organizmalar üzerinde MP toksisitesinin mümkün olduğuna dikkat çekilmiştir (El Kholy ve Al Naggar, 2023). Ek olarak Alaraby vd. (2022)'nin gerçekleştirdikleri çalışmada PS-NP'lerinin *Drosophila* larvalarının bağırsak bariyerini geçerek hemolenfe kadar ulaştığı bildirilmiştir. Farklı boyutlardaki MP ve NP'lerin karasal organizmaların bağırsak bariyerini geçerek doku ve organlarda biriktiği, dolaşım sistemine katıldığı ve immüniteyi tetiklediği bu ve bunun gibi literatürde yer alan birçok çalışmada bildirilmiştir (Al-Jaibach vd., 2018; Turna vd., 2022; El Kholy ve Al Naggar, 2023; Elmekawy vd., 2023).

Hem literatürde yer alan çalışmalar hem de tez kapsamında yapılan çalışmalar toksik özelliklere sahip olan PS-MP'ler gibi yabancı maddelerin böcek bağışıklığını etkilediğini göstermekle birlikte mikroplastiklerin boyut küçüldükçe ve maruz kalınan doz arttıkça doku ve organlardan geçerek hemolenfe ulaşabileceğini göstermektedir.

1.4. Humoral Bağışıklık

Humoral savunma mekanizması hemolenf aracılığıyla gerçekleştirilen, bir dizi reaktif ara ürünlerin (oksijen, azot) üretilmesi, antimikrobiyal peptitlerin sentezi (AMP), pıhtılaşma ve melanizasyon olaylarını kapsar (Lavine ve Strand, 2002). Böylece patojenlere ve vücuda giren yabancı maddelere karşı güçlü bir savunma sistemi oluşturulur.

AMP'ler böceklerde yağ dokudan salgılanır. Böceklerdeki yağ dokusu bu özelliği sayesinde humoral savunmada önem arz eder. Hemolenfteki patojenin algılanmasının ardından hızla sentezlenmeye başlayan AMP, patojenin hücre zarını lizise uğratarak yok etmeye başlar. Genel olarak Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera ve Lepidoptera takımlarında tanımlanan AMP'lerin birçoğu dört kategoride sınıflandırılır; Sistein bakımından zengin olan Defensinler, Çekropinler, glisin bakımından zengin olan Attasinler ve Gloverinler ve Lebosinler. Bu peptit türlerinin Gram (+) ve Gram (-) bakterilere ve mantarlara karşı etkili olduğu belirtilmiştir (Hoffman, 1996; Tsakas ve Marmaras, 2010; Hillyer, 2016; Vigneron vd., 2019).

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROS ve RNS), fagosit edilen maddelerin ya da zararlı görülen organizmaların oksidatif patlama (oksijensiz bırakarak öldürme) yoluyla yok edilmesini sağlayan sitotoksik ajanlar olarak ifade edilmektedir. Bu moleküllerin hücre dışındaki litik faaliyeti etkileyerek antibakteriyel yanıt oluşturulmasında görev aldığı belirtilmiştir. Ayrıca ROS ve RNS'nin kapsüllenme sonrasında meydana gelen melanizasyon sürecinde de rol oynayarak patojenlerin öldürülmesini sağladıkları öne sürülmüştür (Barnes, 2000; Tsakas ve Marmaras, 2010; Hillyer, 2016; Altuntaş vd., 2021).

Melanizasyon, bakteri, mantar, parazit ve yabancı maddelere karşı gerçekleştirilen önemli bir humoral bağışıklık tepkisidir. Enkapsülasyon ve nodülasyon olaylarının belirteci olarak hücresel bağışıklıkta da temel rol oynar. Melanizasyon süreci, önositoid hücrelerinin profenoloksidaz (proFO) enzimini aktifleştirmesiyle başlayıp bir dizi protein çapraz bağlanma reaksiyonları sonucu fenoloksidaz (FO) enziminin oluşmasıyla ve melanin senteziyle son bulur (Nivetha vd., 2023). Patojen etrafında biriken melanin koyu renkli proteinler olarak gözükür. Patojeni hemolenften izole eder ve oksidatif açıklık oluşturarak öldürülmesini sağlar (Barnes, 2000; Rasmussen, 2014; Hillyer, 2016). Bu nedenle FO aktivitesinin belirlenmesi böceğin melanizasyon yolu ile gösterdiği doğal immün yanıtının gücünün ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan önemli bir tekniktir (Teng vd., 2016; Vigneron vd., 2019; Altuntaş vd., 2021). Urbanski vd. (2018)'nin yaptıkları çalışmada 1 µm çapındaki lateks boncukların *T. molitor*'un farklı gelişim evrelerinden (larva, pupa, ergin) elde edilen hemositlerde farklı tepkilere neden olduğu, toplam hemosit sayısı ve FO aktivitesinde de değişimin olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar lateks boncukları gibi benzer boyutlardaki MP maruziyetinin de böceklerde FO aktivitesi ve hücresel immün yanıtlarla ilişkili olan enkapsülasyon ve melanizasyon

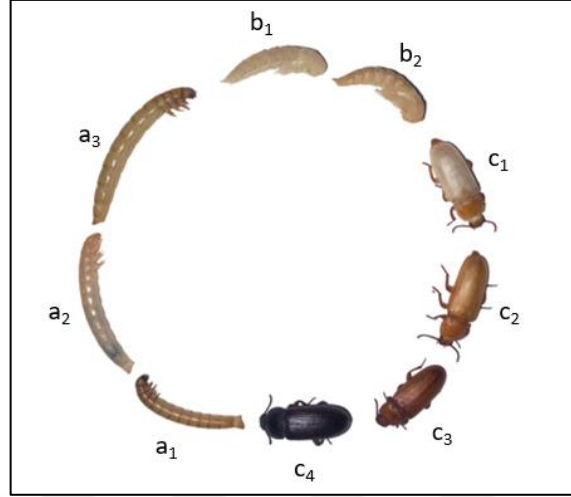
mekanizmalarında değişikliğe neden olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan, Silva vd. (2021) yaptıkları çalışmada boyutları 32–63 µm arasında değişen PE-MP maruziyetinin yüksek dozlarda model böcek olarak değerlendirilen *Chironomus riparius* (palyaço sineği) larvalarında bağışıklık yanıtının bir göstergesi olan FO aktivitesinde artışa neden olduğunu belirlemiş ve bunun MP’lerin böceklerin doğuştan gelen bağışıklık sistemini tetiklediğine dair ilk kanıtlar olduğunu bildirmişlerdir (Silva vd. 2021).

Melanizasyonu başlatan FO enzimi aynı zamanda pıhtılaşmada da etkilidir. Pıhtılaşma, böcek yaralanmasında hemolenfteki hemositlerin yaralı bölgeye göç ederek patojenin ve yaranın kapatılmasını kapsar. İlk olarak granülosit ve plazmatosit hücreleri yaralı bölgede yumuşak pıhtı oluşturur. Daha sonra melanin sentezlenerek pıhtı katılır. Bu süreç hastalık yapıcı etkenlerin vücuda girmesini engelleyerek doku onarımını sağlar (Barnes, 2000; Bidla vd., 2005; Strand, 2008; Rasmussen, 2014).

1.5. Model Böcek *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Larvaları “sarı unkurdu (yellow mealworm)”, erginleri ise “kara böcek (darkling beetle)” olarak adlandırılan *T. molitor*, holometabolik bir böcektir. Yaşam süresi boyunca larva, pupa ve ergin olmak üzere üç farklı gelişim evresi geçirir (Şekil 1.2). Genellikle depolanmış tahıl ürünlerini istila etmesi nedeniyle değirmen zararlısı olarak bilinirler (Punzo ve Mutchmor, 1980; Vigneron vd., 2019; Zhang, X. vd., 2019). Ancak *T. molitor*, larvalarının yüksek protein (%37-47) ve yağ (%46) içeriğine sahip olması ile artan gıda ihtiyacı için sürdürülebilir bir alternatif besin kaynağı olarak Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından onay almış ilk böcek olmasını, böylece yenilebilir ekonomik-faydalı böcekler kategorisinde yer almasını sağlamıştır (EFSA, 2015; Errico vd., 2021). Hali hazırda insan beslenmesinde günümüzde Asya, Afrika ve Güney Amerika’da yer alan çeşitli ülkelerde tüketilmektedir (Halloran ve Vantom, 2020; Errico vd., 2021; Bordiean vd., 2022; Andaç ve Tuncel, 2023). *T. molitor* larvaları ve pupaları pet ve çiftlik hayvanlarının beslenmesinde canlı yem olarak kullanılabildiği gibi, larvalardan üretilen pelet yemler kanatlı hayvanlar, çiftlik hayvanları ve balık yetiştiriciliğinde ek protein kaynağı olarak da değerlendirilmektedir (Özsoy ve Gündoğdu, 2017; Errico vd., 2021; Dreyer vd., 2021; Andaç ve Tuncel, 2023). Larvaların hızlı büyümesi, arpa, buğday, kepek gibi tahıl ürünleri ve havuç, patates, elma gibi organik atıkları tüketmesi ile kültürü kolay ve ekonomiktir. Böylece böcek çiftliklerinde üretiminde daha az su, sera gazı ve amonyak tüketimi sağlamaktadır (Oonincx ve De Boer, 2012; Errico vd., 2021). Ayrıca

çeşitli plastikleri yeme ve zengin bağırsak mikrobiyotası sayesinde degradasyona uğratması ile “plastivor” olarak adlandırılarak sürdürülebilir plastik çalışmalarında dikkat çekmeye başladı (Yang vd., 2018a ; Yang vd., 2015b ; Jiang, S. vd., 2021).



Şekil 1.2. *T. molitor* gelişim evreleri (a₁: küçük instar larva, a₂: yeni deri değiştirmiş larva, a₃: son instar larva; b₁: yeni pupa, b₂: pupa; c₁: yeni ergin, c₂-c₃: genç ergin, c₄: yetişkin ergin)

Kültürünün kolay ve nispeten maliyetsiz olması ile dünya çapında yetiştirilebilmesinin yanı sıra *T. molitor*, sahip olduğu hücresel ve humoral bağışıklık özellikleri ile immünolojik, genetik ve toksikolojik araştırmalarda da alternatif ön model organizma olarak dikkat çekmektedir (Vigneron vd., 2019; Ali vd., 2020; Sanchez-Hernandez, 2021; Nowicki vd., 2021; Brai vd., 2023; Czarniewska vd., 2023; Elmekawy vd., 2023; Peng vd., 2023; Urbanski vd., 2023). Memeli modeller yerine omurgasız model organizmaların doğal immün yanıt testlerinde kullanılması ve sürdürülmesi özellikle yüksek tekrarlı araştırmalar için hem daha ucuz hem de daha uyumludur (Kavanagh ve Reeves, 2004; Vigneron vd., 2019). Ayrıca omurgasız model organizmalarla yapılan çalışmalarda etik kurallarla ilgili problemler bulunmamaktadır (Cook ve McArthur, 2013; Altuntaş vd., 2020). Bu nedenle *T. molitor*'un hem mitokondriyal genom dizisinin yayınlanmış olması hem de sahip olduğu immünolojik özelliklerden dolayı klinik öncesi patolojik, moleküler, immünolojik, genetik ve farmakolojik araştırmalarda kullanımı önem kazanmıştır (Liu ve Wang, 2014; De Souza vd., 2015; Vigneron vd., 2019; Brai vd., 2023).

1.5.1. Sistematikteki yeri

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Coleoptera

Familya: Tenebrionidae

Cins: *Tenebrio*

Tür: *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Görsel 1.1)



Görsel 1.1. *Tenebrio molitor* larva

1.6. Amaç ve Hipotez

Çevrede biriken plastik atıkların hava şartlarıyla, toprak mikroorganizmalarının faaliyetleriyle ve bazı fiziksel olaylar ile MP artışına neden olduğu bilinmektedir. Bu MP'ler arasında yaygın olarak görülen PS, çoğunlukla gıda endüstrisinde kullanılan sentetik bir polimer olup en yaygın görülen çevresel kirleticilerdendir. Plastivor böcek *T. molitor*'un PS içeren plastiklerin biyodegradasyonunu nasıl gerçekleştirdiğine yönelik literatürde çok sayıda güncel çalışma yer alırken, daha büyük boyutlardan ayrılan bu MP'lerin bağırsak lümeninden geçerek dolaşımdaki hücrelerde birikmesi söz konusu olup meydana getirebileceği sitotoksik ve genotoksik etkilere yönelik literatürdeki veriler yeterli değildir. Bu nedenle “düşük boyutlardaki MP maruziyetine bağlı olarak plastivor böcek *T. molitor*'da immünite etkilenir mi?” sorusu üzerinde yoğunlaşıldı. Böcek bağışıklığının araştırılması, ana bağışıklık yollarının ve yanıtlarının bilinmesi MP'ler gibi çevreyi kirleten atıkların canlı organizmalar üzerindeki potansiyel immünolojik ve genotoksik etkilerinin anlaşılması açısından da önemlidir. Bu nedenle tez kapsamında 1µm boyuttaki PS-MP'lerine artan dozlarda maruziyetin model organizma *T. molitor*'un

hücrel ve humoral bağışıklığı üzerindeki olası immonolojik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla;

- Hücrel bağışıklığın temel ögesi olan hemositlerdeki davranışsal farklılıklar (toplam hemosit sayımı, farklı hemosit sayımı, mitotik indeks, hemosit yayılması ve enkapsülasyon),

- Genotoksisitenin hücrel düzeydeki göstergeleri olan apoptotik, nekrotik ve anormal hücre oluşumları,

- Humoral bağışıklığın temel göstergesi olan melanizasyon tepkisi,

- Doza bağlı DNA hasarının belirlenmesi,

- Larvaların biyolojisi ve gelişimi üzerindeki etkilerinin incelenmesiyle hedeflenmiştir.

Böylece tez kapsamında hem “model” hem de böcek çiftliklerinde etkin olarak üretilen “ekonomik-faydalı” karasal böcek kullanılması MP kirliliğinin ekofizyolojik ve ekotoksikolojik etkilerine yönelik daha fazla bilgi edinilmesi sağlanmıştır. Bu bağlamda yapılan bu çalışmada yaygın bir çevre kirliliğine neden olan PS-MP’lerinin *T. molitor*’da immünotoksik ve genotoksik etkilerinin olup olmadığı belirlenerek, bu etkilerin biyolojik gelişim, immünite ve hücrel düzeydeki ilişkisi değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Model Böcek *T. molitor* Larvalarının Stok ve Süksesif Kültürü

T. molitor kültürü, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Hayvan Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan D51-40 ve D51-41 nolu iklimlendirilmiş böcek odalarında gerçekleştirildi.

Stok kültür $27 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, 65 ± 5 bağıl nem ve 8 saat aydınlık 16 saat karanlık şartlarının sağlandığı iklim odalarında yetiştirildi. *T. molitor*'un stok ve deneysel çalışmada kullanılacak süksesif kültürlerindeki larval ve ergin bireylerin beslenmesinde %70 buğday kepeği, %20 buğday unu ve %20 maya-vitamin-mineral (Vitamin A, D, E ve Niacin, Maya, Sodyum, Magnezyum, Kalsiyum ve iz elementler, PR0114) karışımı ile hazırlanan sentetik besin kullanıldı. Hazırlanan besinin sterilizasyonu -20°C 'de 96 saat bekletilerek sağlandı. Larva ve ergin bireylerin su ihtiyacı ise taze havuç ile karşılandı (Özsoy ve Gündoğdu, 2017).

Yumurtadan yeni çıkan ve küçük instar evresindeki larvaların besin ihtiyacının giderilmesi, ortamdaki dışkı ve havuç artıklarının uzaklaştırılması için haftada iki kez kültür bakımı yapıldı. Kültür bakımı sırasında son döneme ulaşarak pupa giren larvalar yumurtlama kabına alınarak kanibalizmin önlenmesi ve pupal yaşam süresinin sağlıklı bir şekilde tamamlanması sağlandı. Yaklaşık üç hafta sonunda yumurtadan çıkan larvalar besinle birlikte ayrı bir kaba alındı. Yaşlı erginlerin yumurtlama kabından uzaklaştırılması ve yeni pupaların eklenmesiyle kültürün devamlılığı sağlandı.

Deneysel çalışmalarda kullanılacak olan süksesif kültürün kurulmasında stok kültürden alınan dişi ve erkek pupaların cam kaplarda erginleşmesi sağlandı. Cam kabın boyutuna göre yeterli miktarda yumurta bıraktıktan sonra erginler alınarak deneysel çalışmalarda yumurtadan çıkan sağlıklı larvalar kullanıldı. Erginler ise sadece kültürün devamlılığı için kullanıldı.

2.2. PS-MP Dozlarının ve Deneysel Grupların Belirlenmesi

Deneysel çalışmalarda $1\ \mu\text{m}$ çapındaki ticari olarak elde edilen PS-MP ($d = 1.05\ \mu\text{m}$, diameter = $1\ \mu\text{m}$, Sigma, 89904-5ML-F) solüsyonu distile su ile seyreltilerek kullanıldı. Hem doz belirlemesine yönelik gerçekleştirilen ön çalışmalardan (5 – 80 mg/ml arasında artan PS-MP) elde edilen veriler hem de Özgen (2022) ve Gökkaya (2022) tarafından yapılan çalışmalarda belirtilen benzer dozlar göz önünde

bulundurularak “5, 10, 20 ve 40 mg/ml” olmak üzere kontrol grubu ile birlikte 5 farklı doz deneysel analizler için kullanıldı. Her bir doza ait PS solüsyonları larval besin içerisine eklenerek homojen karışım sağlandı. Kontrol grubu için sadece distile su içeren besinler kullanıldı. Bu gruplar literatürde yer alan ve yapılan ön çalışmalardan faydalanılarak 100 larvaya 3 gr besin + 1 ml madde verilecek şekilde tasarlandı. Her 5 günde bir bu oran korunacak şekilde larvalar “ 120 ± 5 mg” ağırlığına ulaşana kadar “besin + madde” takviyesi yapıldı. Belirlenen ağırlığa ulaşan larvalar deneysel çalışmalarda kullanıldı. Kurulan deneysel gruplar $27 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%65 \pm 5$ bağıl nem ve 8A:16K (sa) şartlarının sağlandığı böcek iklim odalarında yetiştirildi.

2.3. PS-MP Dozlarının *T. molitor*’un Biyolojisi ve Gelişimi Üzerindeki Etkisi

10 ± 5 mg ağırlığındaki sağlıklı 10’ar adet larva süksesif kültürden seçilerek, içerisinde ilgili PS MP dozu (mg/ml) ve 15 gr besin (%70 buğday kepeği, %20 buğday unu ve %20 mayalı vitamin karışımı) bulunan 250 ml’lik cam beherlere alındı (Şekil 2.1). Kontrol grubu için ise distile su ve 15 gr besin kullanıldı. Her bir deneysel gruptaki larvalar ergin aşamaya kadar günlük olarak takip edildi. Bu süreç içerisinde tüm gruplar her 7 (bir hafta) günde bir kontrol edilerek tüketilen besin miktarı ve bırakılan dışkı ile birlikte larval, pupal ve ergin ağırlıkları ölçüldü. Aynı zamanda larval gelişim süresi (larval aşamadan pupal aşamaya kadar geçen süre) ve pupal gelişim süresi (puplaşmadan erginleşinceye kadar geçen süre) de belirlendi. Böylece *T. molitor*’un gelişim sürecinin ve biyolojisinin artan dozlarda PS-MP’lerinden değişip değişmediği belirlendi. Biyolojik gözlem ve spesifik büyüme oranı (SGR) verilerinde her doz ve kontrol grubu için üç tekrarlı olacak şekilde 10’ar larva kullanıldı (n=30).

Farklı dozlarda PS-MP’lerine maruz kalan *T. molitor* larvalarının büyüme ve beslenme performansı, Said ve El Defrawy (2022)’e göre aşağıdaki parametreler üzerinden hesaplandı: ağırlık kazancı (WG), spesifik büyüme oranı (SGR), besin dönüşüm oranı (FCR), besin dönüşüm verimliliği (FCE) ve hayatta kalma oranı (SR). Buna göre belirlenen parametreleri hesaplamak için aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

- Larval ağırlık artışı (weight gain %WG): $100 * [(\text{Son ağırlık} - \text{Başlangıç ağırlığı}) / \text{Başlangıç ağırlığı}]$.
- Larval besin dönüşüm oranı (g/g food conversion rate, FCR): $(\text{Tüketilen besin ağırlığı} / \text{Larvaların kazandığı ağırlık})$

- Larval besin dönüşüm verimliliği (food conversion efficiency, %FCE): $100 * (\text{Larvaların kazandığı ağırlık} / \text{Tüketilen besin ağırlığı})$
- Hayatta kalma oranı (survival rate, %SR): $100 * [(\text{Başlangıçtaki larva sayısı} - \text{Ölü larva sayısı}) / \text{Başlangıçtaki larva sayısı}]$
- Spesifik Büyüme Oranı (specific growth weight %SGR) = $100 * [(\text{Canlı larvaların son ağırlığı}) - (\text{Başlangıç ağırlığı}) / \text{toplam beslenme günü}]$

Belirlenen PS-MP dozlarına maruz kalan ve kalmayan tüm deney gruplarında larvaların ergin olmasına kadar geçen süre ortalama 35 ± 5 gün olarak gözlemlendi. Bu süre göz önüne alınarak büyüme ve beslenme performansı hesaplamaları yapıldı. Tüm deney grupları $27 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%65 \pm 5$ bağıl nem ve 8 saat aydınlık 16 saat karanlık şartlarının sağlandığı böcek iklim odalarında inkübe edildi. Büyüme ve beslenme performans parametrelerinde her doz ve kontrol grupları için 10 larvadan elde edilen ortalama veriler kullanılarak, üç tekrarlı istatistiksel analiz yapıldı.



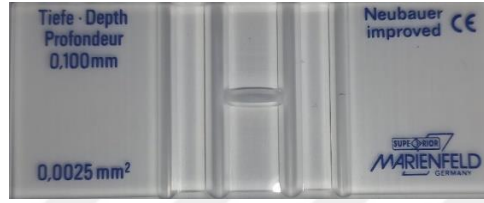
Şekil 2.1. Farklı dozlarda PS-MP eklenen larval besin grupları ve gelişim biyolojisi deney düzeneği

2.4. PS-MP' Dozlarının *T. molitor* İmmün Sistemi Üzerindeki Etkileri

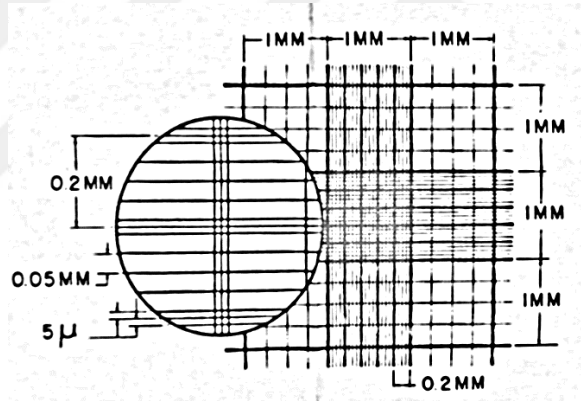
2.4.1. Toplam hemosit sayısı

PS-MP'lerinin dolaşımdaki toplam hemosit sayısına etkilerinin belirlenmesi amacıyla larvalardan hemolenf alındı. 120 ± 5 ağırlığına ulaşan larvalardan hemolenf toplamadan önce larvalar hareket yeteneklerinin azalması için 1-3 dakika buz üzerinde bekletilerek anestezi edildi. Larvaların $\%70$ 'lik etanol ile yüzey sterilizasyonu sağlandıktan sonra, birinci veya ikinci toraks ekstremite kaidesi ince uçlu makas ile kesildi ve larvalardan 4 µl hemolenf mikropipiler tüp yardımıyla alındı. Toplanan

hemolenf buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 36 µl pıhtılaşma engelleyici solüsyon (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na₂EDTA ve 0,041 M sitrik asit, pH: 4.5) bulunan eppendorf tüplere aktarıldı (Altuntaş vd., 2012). Elde edilen karışımdan mikropipet ile 10 µl örnek çekilerek 0.100 mm derinliğe sahip Neubauer hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer; Superior, Germany) (Şekil 2.2) aktarıldı ve faz-kontrast mikroskopunda (Leica DM6000 B) hücre sayımı yapıldı (Altuntaş vd., 2012). Deneyde her doz ve kontrol grubu için üç tekrarlı olacak şekilde 10'ar larva kullanıldı (n=30).



Şekil 2.2. Neubauer hemosimetre



Şekil 2.3. Neubauer hemositometresi sayım alanı

Neubauer hemositometresi bir çukurlukla birbirinden ayrılan iki farklı sayım alanı bulunduran bir sayma lamıdır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane 1 mm²'lik bölümler (büyük kareler) bulunur. Bunlar 16 orta büyüklükte kareye ayrılır ($1/4 \times 1/4 = 1/16$ mm²). Ortada bulunan büyük kare ise 25 orta büyüklükte kareye ayrılır. Orta büyüklükteki karelerin etrafı çift çizgi ile çevrilidir. Her bir orta kare de 16 küçük kareye bölünmüştür (Şekil 2.3). Böylece, ortadaki alanda 25 orta kare, 400 küçük kare bulunur. Bir küçük karenin alanı $1/20 \times 1/20 = 1/400$ mm²'dir. Sayım alanı dışında kalan kenarlar, sayım alanı yüzeyinden 0,1 mm yüksektedir. Sayım alanı üzerine hemositometrenin lameli konulunca, lamel ile sayım alanı yüzeyi arasında 0.1 mm'lik bir boşluk kalır. Böylece lam ve lamel arasında kalan her karenin hacmi hesaplanabilir: En büyük (1 mm²'lik) karenin hacmi, $1 \times 1 \times 0.1 = 0.1$ mm³ = 0.0001 cm³ = 0.0001 ml'dir. Deney

gruplarında hemositometre laminının orta kısmında bulunan, 25 orta büyüklükte kareye ayrılmış ve her bir orta karenin de 16 küçük kareye bölündüğü 1 mm²'lik büyük karenin tamamı sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi. Mililitredeki toplam hemosit sayılarının hesaplanması için;

Hücre sayısı / ml = Büyük karede sayılan hücre sayısı x Sulandırma kat sayısı x 10⁴ formülü kullanıldı.

2.4.2. Farklı hemosit sayısı, mitotik indeks ve anormal hücre oluşumlarının belirlenmesi

Farklı hemosit sayılarının belirlenmesi Altuntaş vd., (2012) tarafından uygulanan yöntemle göre gerçekleştirildi. PS-MP dozlarının *T. molitor* larvalarındaki farklı hemosit sayısına etkisinin belirlenmesi amacıyla, deney gruplarından elde edilen 120 ± 5 mg ağırlığındaki larvalar kullanıldı. Yöntem 2.4.1'te bahsedildiği gibi ön işlem yapılan larvalardan 10 µl hemolenf alınarak ince yayma preparat hazırlandı. Havada kurutulan preparatlar 3 dk metanol ile fikse edildikten sonra tekrardan havada kurutmaya bırakıldı. Tamamen kuruyan lamalar 30 dk süresince taze olarak 1: 20 oranındaki fosfat tamponu (PBS, pH:7,2) içinde hazırlanan Giemsa (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution) boya çözeltisi içinde boyandı. Boyanan lamalar 1 dakika fosfat tamponu (PBS, pH:7,2) ve 1 dakika distile suda yıkandı. Yıkama işleminden sonra havada kurutulan lamalar entellan (MERCK, HX73846161) ile kapatılarak ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi. Hazırlanan preparatlarda farklı hemositlerin oranı (%), mitotik indeks (%) ve anormal hücrelerin belirlenmesi ile deney grupları arasındaki değişimler değerlendirildi. Her preparatta farklı alanlardan olmak üzere 1000 adet hücre sayıldı. Deneylerde her doz ve kontrol grubu için üç tekrarlı olacak şekilde 15 larva kullanıldı (n=45).

2.4.3. Hemosit yayılması

Belirlenen dozlarda PS-MP içeren besin verilen larvaların hemositlerinde fagositoz yeteneğinin değerlendirilmesi hemositlerin lam üzerindeki yayılma özelliklerinin incelenmesi ile araştırıldı (Gwokyalya ve Altuntas, 2019). Bu amaçla 120 ± 5 mg ağırlığındaki larvalardan mikropipet tüp yardımıyla alınan 5 µl hemolenf, içerisinde 20 µl soğuk fosfat tamponu (PBS, pH: 7,4 Sigma P3813) bulunan mini santrifüj tüplerine

aktarıldı. Hazırlanan hemolenf + tampon karışımından 20 µl alınarak lam üzerine dairesel hareketlerle yayıldı ve preparatlar nem çemberi (Sigma H6644) kutusuna yerleştirildi. Bu işlemin ardından hemositlerin cama yapışmasını sağlamak için $27 \pm 1^\circ \text{C}$ 'de karanlık ortamda 30 dakika boyunca preparatlar nem çemberi ile birlikte inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hazırlanan preparatlar faz-kontrast mikroskopunda (Leica DM6000 B) 40x objektifte incelendi. Tüm deneyler her dozda 15 adet larva olacak şekilde üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi (n=45). Hücre yayılma oranları yüzde veriler olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Hücre yayılması oranı (\%)} = (\text{yayılmış hücre sayısı}) / (\text{toplam hücre sayısı}) \times 100$$

2.4.4. Fenoloksidaz aktivite tayini

T. molitor larvalarındaki melanizasyonun değerlendirilmesi için fenoloksidaz enzim aktivite analizi yapıldı. Bu amaçla belirlenen PS-MP dozlarına maruz bırakılan 120 ± 5 mg ağırlığındaki larvalardan alınan 5 µl hemolenf içerisinde 100 µl soğuk fosfat tamponu (PBS pH:6,4, Sigma P3813) bulunan eppendorf tüplere alınarak en az 24 saat olmak üzere -80°C 'de hemositlerin lizisi için bekletildi. Larval hemolenfteki fenoloksidaz aktivitesi L-DOPA 'dan dopakrom oluşmasının 492 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına göre belirlendi. Bu yöntemde stok PBS (pH: 6,4) içinde hazırlanan 20 mM L-Dopa (Alfa Aesar A11311) solüsyonundan 100 µl ve tamponlanmış hemolenf örneklerinden 100 µl alınarak 96 kuyucuklu mikropate küvetinde karıştırıldı. Karışımındaki fenoloksidaz aktivitesinin hesaplanması için 27°C 'de 492 nm'de BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında (Gen 5 programı) 90 dakika boyunca 5 dakikada bir okuma alınarak analiz edildi. Elde edilen absorbans değerlerinden ve protein miktarı verilerinde U/mg protein/dakika olan spesifik enzim aktivitesi hesaplandı. Tüm deneyler her dozda ve kontrol grubunda 15'ar adet larva olacak şekilde üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi (n=45).

2.4.4.1. Total protein tayini

Fenoloksidaz spesifik aktivitesinin belirlenmesinde gerekli olan larval hemolenfteki protein miktarının belirlenmesi için hem kontrol hem de deney gruplarından elde edilen 10'ar larvadan 5 µl hemolenf alınarak ($5 \times 10 = 50$ µl) içinde 1 mg feniltiyoüre (Sigma-Aldrich P7629, $\geq 98\%$) bulunan tüplere konularak -80°C 'de muhafaza edildi.

Hemolenf alma işlemi yöntem 2.4.'de bahsedildiği gibi yapıldı. Protein ölçümü için örnekler +4 C'de 10000 g'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant kısım ayrı tüplere alındı ve Bradford (1976) yöntemine göre analiz yapıldı. Standart protein olarak sığır serum albümin kullanılarak protein miktarı mg/ml olarak hesaplandı. Hemolenf örnekleri oluşturulan standart grafik aralığına girene kadar sulandırma işlemi gerçekleştirildi. Buna göre seyreltilen hemolenf örneklerinden 5'er µl alınarak üzerlerine 250 µl Bradford reaktifi eklendikten 5 dakika sonra BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında-Gen 5 programında 595 nm'de ölçüm yapıldı. Tüm deneyler her doz ve kontrol grubu için sekiz tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.4.5. Enkapsülasyon

Belirlenen dozlarda PS-MP içeren besin verilen larvaların enkapsülasyon davranışlarının belirlenmesi Altuntaş vd. (2022) tarafından geliştirilen yöntemle *in vitro* olarak gerçekleştirildi. Kapsülleme için Coomassie mavisi (Brilliant Blue G Sigma) ile boyanmış Sephadex DEAE A-50 (sigma, 40-125 µm çap) kromatografi boncukları kullanıldı (Altuntaş, 2012). Boyanmış 20-30 adet boncuk 40 µl PBS (pH: 7,4) çözeltisine aktararak seyreltildi. Boncuk + PBS çözelti içerisine larvalardan alınan 10 µl hemolenf eklenerek karışım 1,5 ml'lik Eppendorf tüplere alındı. Hazırlanan tüpler çalkalayıcıda 25 rpm'de 2 saat boyunca tamamen karanlıkta inkübe edildi. İşlem sonrasında karışım lam üzerine alınarak faz-kontrast mikroskopunda (Leica DM6000 B) incelendi. Deneyler her grupta 15 larva olacak şekilde üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi (n=45).

Hemositlerin kapsüllenme davranışı Teng vd. (2016) tarafından tarif edilen puanlama prosedürüne (0-5) göre belirlendi. Buna göre;

0- Kapsülleme yok

1- Boncuğa 50'den fazla hemosit bağlı

2- Boncuğa 50'den fazla hemosit bir katman oluşturacak kadar bağlı

3- Kapsül kalınlığı 1 katmandan fazla ancak boncuk yarı çapının yarısından az

4- Kapsül kalınlığı boncuk yarı çapından biraz fazla

5- Kapsül kalınlığı boncuk yarı çapından daha fazla

Enkapsülasyon indeksi ise aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

Enkapsülasyon İndeksi (%) = $[\Sigma (\text{Tanımlanan enkapsülasyon derecesine sahip boncukların sayısı} \times \text{enkapsülasyon skoru} / \text{toplam boncuk sayısı} \times 5)] \times 100.$

2.4.6. Comet analizi (tek hücre jel elektroforezi) ile DNA hasarının belirlenmesi

Artan dozlarda (5, 10, 20 ve 40 mg/ml) PS-MP'lerinin *T. molitor* hemositlerindeki DNA hasarının belirlenmesi amacıyla COMET analizi yapıldı. Singh vd. (1988) tarafından belirlenen yöntemle göre tek hücrede meydana gelen DNA kırıklarının belirlenmesi için alkali ortamda elektroforetik yürütme işlemi gerçekleştirildi. PS dozlarına bağlı olarak meydana gelen DNA hasarının belirlenmesi için 120 ± 5 mg ağırlığına ulaşan kontrol ve doz grubu larvalarından alınan 5 µl hemolenf örnekleri 95 µl (%1'lik) düşük kaynama dereceli agaroz (LMPA) bulunan tüplere alınıp fiksasyon işlemi için üzeri önceden %1'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) ile kaplanmış özel lamplara yerleştirildi ve üzerleri lamel ile kaplanarak 4°C'de 15 dakika bekletildi. Agaroz jele gömülen bu karışımdaki hemositlerin hücre membranları, sitoplazma, nükleoplazma gibi yapılarının uzaklaştırılarak nükleozomların çözünmesi için hipertonik bir lizis (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL, %1'lik TritonX-100 ve %10'luk dimetilsülfoksit (DMSO), pH: 10,0) solüsyonu ile muamele edildi. DNA'nın süperkoil yapısının açığa çıkarılması ve görüntülenebilmesi için ise yüksek alkali bir tampon (10N NaOH ve 200 mM EDTA, pH: 13) kullanıldı. Bu işlemler için hemolenf örneklerinin yüklendiği lampları, elektroforez tankı içerisine alınarak tamponun bulunduğu bu ortamda 45 dakika boyunca bekletildi ve ardından elektrotlar bağlanarak DNA kırıklarının görünür hale gelmesi için 30 dakika boyunca 20 Volt ve 300 mA'de katotdan anoda doğru yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işleminden sonra lampları nötralizasyon (0.4M Tris-HCl, pH = 7.4) solüsyonunda 15 dakika boyunca bekletilip distile su ile yıkandı. Son olarak DNA kırıklarının görünür hale gelmesi için lampları floresan bir boya olan SYBR Green ile bir gece boyunca boyandı. Tüm işlemler 4°C'de ve karanlık ortamda gerçekleştirildi. DNA kırıklarının mikroskopik görüntülerinin elde edilmesi 40X'lik objektifde floresan mikroskopta (Leica DM6000 B, GreenFilter, 540-550 eksitasyon dalga boyu, 575-625 emisyon dalga boyu) gerçekleştirildi. DNA hasar tespiti için her bir dozda ve kontrol grubunda 15 larvadan elde edilen toplam 750 hücre analiz edildi. DNA kırıklarına ait elde edilen görüntülerin değerlendirilmesi COMET analiz programında (Comet Assay IV; Perceptive Instruments Ltd., UK-İtalya) gerçekleştirildi. Comet Assay IV programında otomatik ölçüm yapılarak her bir verinin kuyruk yoğunluğu (tail intensity, %), kuyruk uzunluğu (tail length, µm), kuyruk momenti (tail moment, arbitrary units) ve kuyruk göçü (tail migration, µm) parametreleri kullanıldı. Kuyruk momenti

Olive vd. (1990)'in tanımına göre, kuyruk uzunluğunun kuyruktaki floresan yoğunluğu veya göç bölgesindeki DNA yüzdesi ile çarpımı olarak formüle edildi.

2.5. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS veri analiz yazılım programı (IBM Corp. Release 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) ile gerçekleştirildi. Yüzdesel veriler Arcsin dönüşümleri yapılarak doğrusal hale getirildikten sonra, tüm verilerin Lavene's testi ile normal dağılıp dağılmadıkları belirlendi. Yapılan deneysel analizler sonucunda normal dağılım gösteren veriler için One Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) uygulanarak, Tukey, Tamhane ve LSD (Least Significant Difference) ile gruplar arası güvenilirlik testleri gerçekleştirildi. Normal dağılıma sahip olmayan verilerin istatistiksel farklılıklarını belirlemek için ise Kruskal Wallis H ve Mann Whitney U testleri yapıldı. Deneylerde elde edilen tüm sonuçlar, %95 güven aralığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi ($p < 0.05$).

3. BULGULAR

3.1. PS-MP Dozlarının *T. molitor* Biyolojisi ve Gelişimi Üzerine Etkisi

T. molitor'un larval, pupal ve ergin evrelerinin artan PS-MP dozları ile beslenme sonrası biyolojik gelişim parametrelerindeki değişimler Tablo 3.1'de verilmektedir. En uzun larval yaşam süresi (LYS) en yüksek doz olan 40 mg/ml'de olduğu belirlenirken, kontrol grubuna göre tüm doz gruplarında artış olduğu tespit edildi ($\chi^2=41,183$; $df=4$; $p=0,000$). LYS'nin PS-MP'nin dozları arasında ise 40 mg/ml haricinde istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlendi.

En uzun pupal yaşam süresi (PYS) 20 ve 40 mg/ml doz gruplarında görülürken, en kısa pupal yaşam süresi kontrol grubunda tespit edildi ($\chi^2=20,531$; $df=4$; $p=0,000$). Ancak PYS dozlar arasında farklılık göstermedi.

Larval ağırlık (LA: $F=8,636$; $df=4, 145$; $p=0,000$), pupal ağırlık (PA: $F=6,836$; $df=4, 145$; $p=0,000$) ve ergin ağırlık (EA: $F=6,210$; $df=4, 145$; $p=0,000$) olmak üzere belirlenen üç parametrenin de uygulanan PS-MP doz gruplarında kontrole kıyasla bir azalma olduğu tespit edildi. Her üç ağırlık parametresi için de en düşük değerlerin en yüksek doz grubu olan 40 mg/ml'de olduğu görülmektedir. Besinle PS-MP dozlarına maruz kalan deney gruplarında, dozlar arasında LA ve PA için önemli değişimler olmaz iken, EA'nın doz arttıkça azaldığı belirlendi.

Tablo 3.1. PS-MP'lerine besin yoluyla maruz kalan *T. molitor* larvalarının gelişim biyolojisinde meydana gelen değişimler

PS-MP (mg/ml)	Biyolojik Gelişim Parametreleri (ORT $\pm$ SH)*				
	LYS (Gün)	PYS (Gün)	LA (mg)	PA (mg)	EA (mg)
Kontrol	47,87 $\pm$ 0,94a	6,50 $\pm$ 0,09a	128,60 $\pm$ 3,17a	124,43 $\pm$ 3,16a	111,57 $\pm$ 2,80a
5	53,33 $\pm$ 2,22b	6,83 $\pm$ 0,11b	110,47 $\pm$ 2,70b	107,93 $\pm$ 2,66b	101,23 $\pm$ 2,31b
10	52,73 $\pm$ 1,13b	6,87 $\pm$ 0,09b	119,73 $\pm$ 2,70c	114,10 $\pm$ 2,54b	102,47 $\pm$ 2,06b
20	54,17 $\pm$ 1,19b	7,00 $\pm$ 0,07b	108,60 $\pm$ 2,27b	106,50 $\pm$ 2,65b	95,87 $\pm$ 2,03cd
40	61,47 $\pm$ 1,52c	7,00 $\pm$ 0,07b	116,10 $\pm$ 2,69bc	110,17 $\pm$ 2,70b	99,57 $\pm$ 2,40bd

* Tüm değerler yüzdesel ortalama (%) ve standart hatayı ($\pm$) temsil eder. ORT: Ortalama; SH: Standart Hata.

* Önemli farklılıklar farklı harflerle belirtilmiştir (a-c). Aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (LYS ve PYS için, $p<0,05$; Kruskal Wallis H, Mann Whitney U testi) (LA, PA ve EA için, $p>0,05$; ANOVA, LSD testi). LYS: Larval yaşam süresi, PYS: Larval yaşam süresi, LA: larval ağırlık, PA: Pupal ağırlık, EA: Ergin ağırlık.

PS-MP'lerine farklı dozlarda maruz kalan *T. molitor* larvalarının büyüme ve beslenme performansına yönelik bulgular ve değişimler ise Tablo 3.2'de verilmektedir. Larvaların ağırlık artışı oranı (%WG, $F=1,683$; $df=4, 10$; $p=0,230$) kontrole göre doz gruplarında azalırken, besin dönüşüm verimliliği (%FCE, $F=2,015$; $df=4, 10$; $p=0,168$) ve hayatta kalma oranı (%SR, $F=0,426$; $df=4, 10$; $p=0,787$) değerlerinde hem dozlar arasında hem de kontrole kıyasla istatistiksel anlamda bir farklılık görülmedi. Besin dönüşüm oranı (g, FCR) bulgularına bakıldığında kontrol grubuna göre diğer doz gruplarında azalma olduğu görüldü. En düşük değer 40 mg/ml olan en yüksek dozda tespit edildi ($F=3,819$; $df=4, 10$, $p=0,039$). Besin ile PS-MP'lerine maruz kalan larvaların pupa girene kadar sergilediği spesifik büyüme oranı değerlerinde (%SGR) ise kontrol ve doz grupları arasında istatistiksel anlamda bir farklılık görülmezken en yüksek değer 40 mg/ml dozda belirlendi ($F=0,214$; $df=4, 145$; $p=0,931$).

Tablo 3.2. Artan dozda PS-MP'leri ile beslenen *T. molitor* larvalarının büyüme ve beslenme performansındaki değişimler

PS-MP (mg/ml)	Büyüme ve Beslenme Parametreleri (ORT $\pm$ SH)*				
	FCR (g)	WG (%)	FCE (%)	SR (%)	SGR (%)
Kontrol	4,00 $\pm$ 4,48a	30,86 $\pm$ 2,02a	29,31 $\pm$ 1,47a	96,67 $\pm$ 3,33a	0,30 $\pm$ 0,01a
5	3,12 $\pm$ 0,014ab	24,50 $\pm$ 4,28a	29,89 $\pm$ 3,53a	93,33 $\pm$ 3,33a	0,30 $\pm$ 0,01a
10	3,00 $\pm$ 0,30ab	20,77 $\pm$ 2,13a	29,63 $\pm$ 0,75a	90,00 $\pm$ 5,77a	0,30 $\pm$ 0,01a
20	3,45 $\pm$ 0,29ab	20,03 $\pm$ 2,97a	25,78 $\pm$ 1,07a	96,67 $\pm$ 3,33a	0,30 $\pm$ 0,01a
40	2,90 $\pm$ 0,10b	22,02 $\pm$ 4,06a	33,16 $\pm$ 0,65a	90,00 $\pm$ 5,77a	0,31 $\pm$ 0,01a

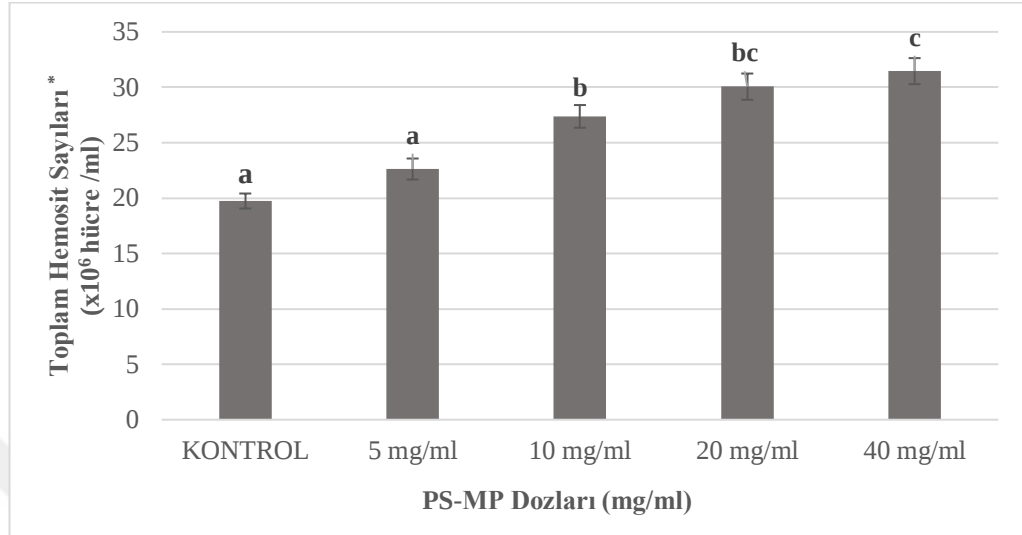
* FCR haricindeki tüm değerler yüzdesel ortalama (%) ve standart hatayı ($\pm$) temsil eder.

* Önemli farklılıklar farklı harflerle belirtilmiş olup (a-b), aynı harfi taşıyan değerler arasında istatistiksel anlamda bir farklılık yoktur ($p<0,05$; ANOVA, Tukey testi) (FCR: besin dönüşüm oranı, WG: ağırlık kazancı, FCE: besin dönüşüm verimliliği, SR: hayatta kalma oranı, SGR: spesifik büyüme oranı).

3.2. Toplam Hemosit Sayısı

T. molitor larvalarında, artan dozlarda (5,10,20,40 mg/ml) PS-MP'lerinin toplam hemosit sayısına (THS) etkisi Şekil 3.1'de verilmektedir. THS'nin madde uygulaması yapılmayan kontrol grubunda $19,74\pm0,68 \times 10^6$ hücre/ml; 5-10-20-40 mg/ml PS-MP dozlarına maruz kalan gruplarda sırasıyla $22,62\pm0,95$, $27,37\pm1,02$, $30,06\pm1,18$, $31,46\pm1,17 \times 10^6$ hücre/ml olduğu tespit edildi. Kontrol grubuna kıyasla, PS-MP'lerine

maruz kalan larvaların hemolenfinde sirküle halde olan hemositlerin sayısında önemli bir artış meydana gelirken, bu artış 10, 20 ve 40 mg/ml PS-MP dozları arasında anlamlı bir değişim gösterdi ($F=23,719$; $df=4, 145$; $p=0,000$).



Şekil 3.1. PS artan dozlarının *T. molitor* larvalarının toplam hemosit sayısına etkisi

* Her çubuk ortalama hücre sayısı ($\times 10^6$) $\pm$ standart hatayı temsil eder. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar farklı harflerle belirtilmiştir (a-c) ($p>0,05$; ANOVA, Tukey testi).

3.3. Farklı Hemosit Sayısı, Mitotik İndeks ve Anormal Hücre Oluşumları

T. molitor'da tespit edilen larval hemosit tipleri Görsel 3.1'de sunulmaktadır. Besin yoluyla PS-MP'nin artan dozlarına maruz kalan *T. molitor* larvalarında hemolenfteki plazmatosit, granülosit, önositoid ve prohemosit oranlarının kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği Şekil 3.2'de verilmektedir ($p<0,05$).

Plazmatosit (%PL) yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla artan PS-MP doz gruplarında (5 mg/ml PS-MP hariç) belirgin bir artış gösterdiği belirlendi. Deney grupları arasında ise PL oranının 5 ve 40 mg/ml arasında anlamlı bir artma yönünde farklılık gösterdiği, 10, 20 ve 40 mg/ml PS-MP arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olmadığı görüldü ($F=13,204$; $df=4, 220$; $p=0,000$). Larval hemolenfteki en yüksek PL oranı kontrol grubuna kıyasla 20 ve 40 mg/ml PS-MP dozlarda yaklaşık %20 oranında bir artış gösterdi (Şekil 3.2).

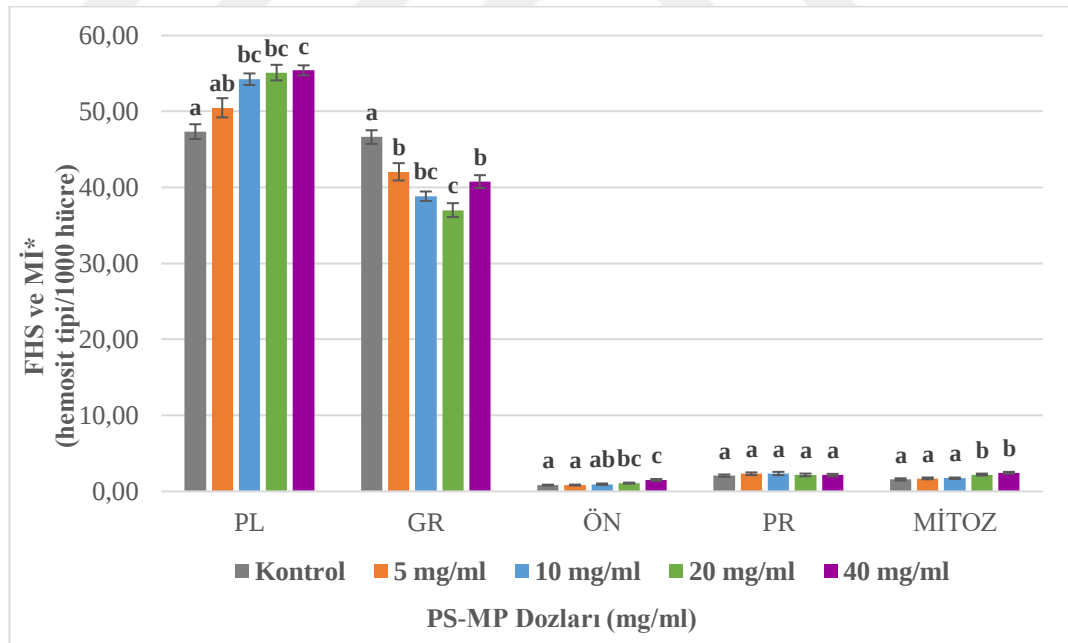
Granülosit (%GR) yoğunluğunda kontrol grubuna göre PS-MP doz gruplarında azalma görülürken, en yüksek doz olan 40 mg/ml PS-MP'nin 10 ve 20 mg/ml dozlarına göre GR oranında artışa neden olduğu tespit edildi ($F=16,472$; $df=4, 220$; $p=0,000$).

Larval hemolenfte sirküle halde bulunan GR oranı kontrole kıyasla PS-MP doz artışına bağlı olarak yaklaşık %10 oranında bir azalma gösterirdi (Şekil 3.2).

Larval hemolenfteki Önositoid (%ÖN) oranı kontrol grubu ile en düşük doz olan 5 mg/ml PS-MP dozu arasında istatistiksel olarak belirgin bir değişiklik göstermezken, artan PS-MP dozları arasında ÖN yoğunluğunda bir artış olduğu tespit edildi ($F=9,876$; $df=4, 220$; $p=0,000$). En yüksek ÖN oranı 40 mg/ml PS-MP dozunda tespit edilerek bu değerin kontrole göre %80 oranında arttığı görüldü (Şekil 3.2).

Besinsel yolla PS-MP'in artan dozlarına maruz kalan *T. molitor* larvalarının hemolenfindeki sirküle Prohemosit (%PR) oranında hem kontrol hem de deney grupları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark tespit edilmedi ($F=0,294$; $df=4, 220$; $p=0,881$) (Şekil 3.2).

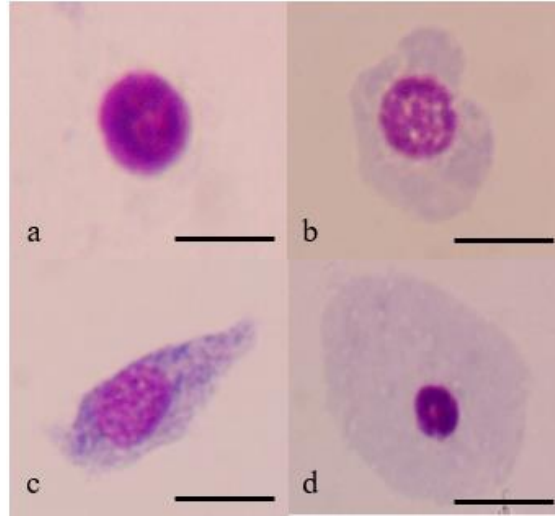
T. molitor larval hemositlerine ait mitotik hücreler Görsel 3.1'de gösterildi. Ayrıca PS-MP'lerine maruz kalan larvalardaki en büyük mitotik indeks, yüksek doz grupları olan 20 ($2,22\pm0,12$) ve 40 ($2,45\pm0,12$) mg/ml'de tespit edilirken kontrol grubu ile 5 ve 10 mg/ml dozları arasında istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı belirlendi ($F=10,325$; $df=4, 220$; $p=0,000$) (Şekil 3.2).



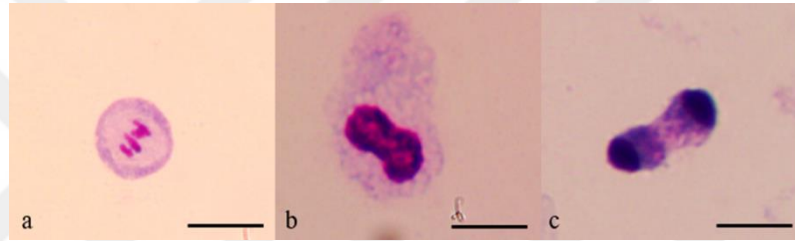
Şekil 3.2. Artan PS-MP dozlarının (5-40 mg/ml) larval hemosit tiplerinin oranında ve mitotik indeks üzerindeki etkileri

* Her sütun farklı hemosit tiplerinin yüzdesel ortalama (%) ve standart hatasını ($\pm$) temsil etmektedir.

* Önemli farklılıklar farklı harflerle belirtilmiş olup (a-c), aynı harfi taşıyan sütunlar arasında istatistiksel anlamda bir fark yoktur ($p>0,05$; ANOVA, Tamhane testi). PL: Plazmatosit, GR: Granülosit, ÖN: Önositoid, PR: Prohemosit, FSH: farklı hemosit oranları, Mİ: mitotik indeks.



Görsel 3.1. *T. molitor*'da Giemsa boyama yöntemi ile tespit edilen hemosit çeşitleri (a: prohemosit, b: granülosit, c: plazmatosit, d: önositoid) (ölçek: 10 μ m, x100 büyütme)



Görsel 3.2. *T. molitor* larvalarında mitoz bölünme evresinde olan hemositler (a-b, ölçek: 30 μ m, x40 büyütme; c, ölçek: 10 μ m, x100 büyütme)

T. molitor larval hemositlerinde tespit edilen mikronükleus (MN), dev çok çekirdekli hücre ve karyoreksis meydana gelen hücre tipleri anormal hücre oluşumları kapsamında değerlendirilmiş olup, apoptotik, nekrotik ve çeşitli anormal hücreler Görsel 3.3 ve 3.4'de gösterilmektedir. Artan dozlarda PS-MP'ye maruziyetin *T. molitor* larval hemositlerindeki apoptotik, nekrotik ve anormal hücre oluşum oranlarına etkisi ise Tablo 3.3'de verilmektedir.

Apoptotik hücrelerin oranı kontrol grubuna kıyasla tüm dozlarda (5-40 mg/ml) belirgin bir artış gösterdi. Ancak dozlar arasında sadece 40 mg/ml PS-MP maruziyetinin larval hemositlerdeki apoptotik hücre oranını azalttığı belirlendi ($F=8,117$; $df=4, 220$; $p=0,000$). Nekrotik hücre oranlarında da kontrol grubuna göre diğer PS-MP doz gruplarında artış olduğu tespit edildi. Doz grupları arasında ise istatistiksel olarak 10 ve 40 mg/ml PS-MP doz gruplarında farklılık olduğu ve en yüksek nekrotik hemosit oranının 40 mg/ml PS-MP'de meydana geldiği tespit edildi ($\chi^2=16,768$; $df=4$; $p=0,002$) (Tablo 3.3).

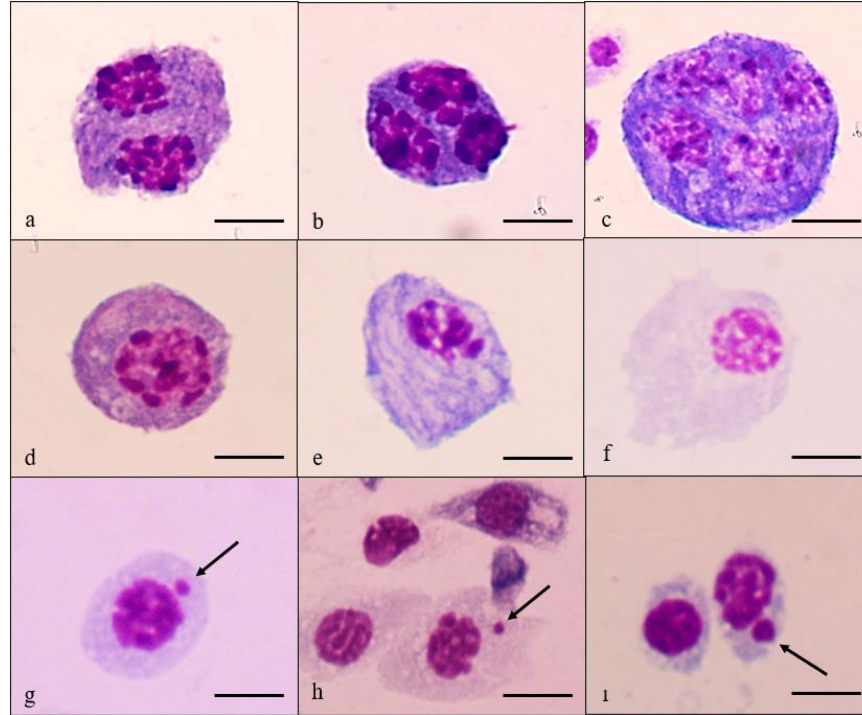
Anormal hücre oluşum oranlarının ise kontrol grubu ile doz grupları arasında istatistiksel anlamda belirgin bir fark ve artış olduğu tespit edildi ($\chi^2=63,599$; $df=4$; $p=0,000$). Dozlar arasındaki en yüksek değerlerin 20 ve 40 mg/ml PS-MP’de olduğu görülürken doz grupları arasında istatistiksel anlamda bir fark olmadığı belirlendi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Artan dozlarda PS-MP dozlarıyla beslenen *T. molitor* larval hemositlerindeki apoptotik, nekrotik ve anormal hücre oranları

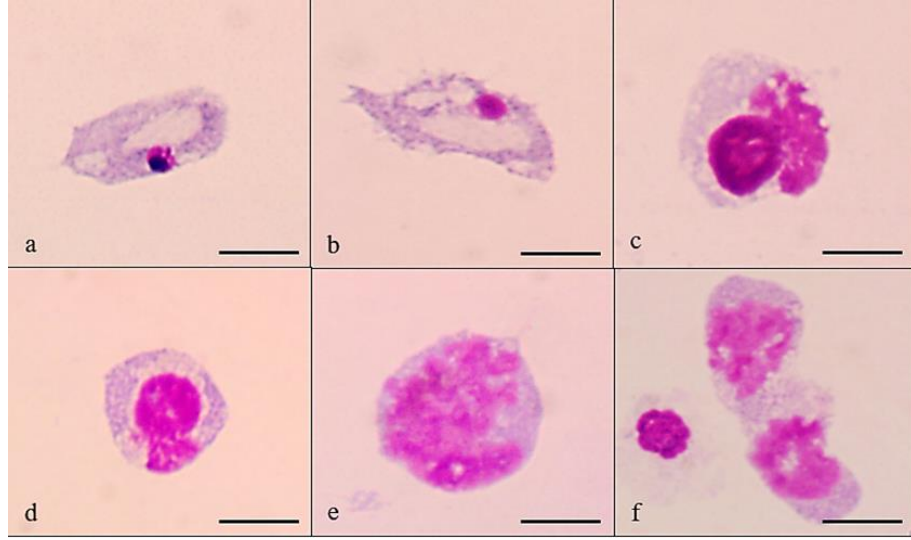
PS-MP (mg/ml)	% (ORT $\pm$ SH) *		
	Apoptotik Hemosit	Nekrotik Hemosit**	Anormal Hemosit**
Kontrol	0,55 $\pm$ 0,06a	0,10 $\pm$ 0,02a	0,09 $\pm$ 0,03a
5	1,31 $\pm$ 0,14b	0,22 $\pm$ 0,04ab	1,33 $\pm$ 0,20b
10	1,42 $\pm$ 0,19b	0,21 $\pm$ 0,04b	1,34 $\pm$ 0,018b
20	1,64 $\pm$ 0,18b	0,20 $\pm$ 0,03bc	1,56 $\pm$ 0,24b
40	1,04 $\pm$ 0,14c	0,29 $\pm$ 0,04c	1,50 $\pm$ 0,27b

* Değerler yüzdesel ortalama (%) ve standart hatayı ($\pm$) temsil eder. ORT: Ortalama; SH: Standart Hata.

* Önemli farklılıklar farklı harflerle belirtilmiştir (a-c). Aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (apoptotik hücreler için, $p>0,05$; ANOVA, Tamhane testi) (nekrotik ve anormal hücreler için, $p<0,05$; Kruskal Wallis H, Mann Whitney U testi).



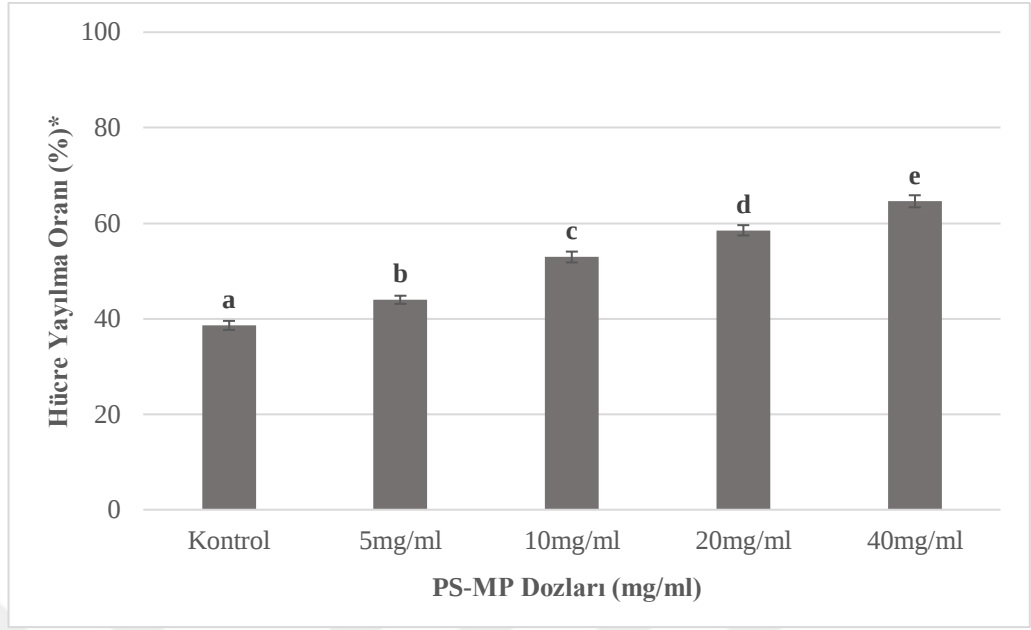
Görsel 3.3. PS-MP’lerine besin yoluyla maruz kalan *T. molitor* larval hemositlerinde tespit edilen dev çok çekirdekli hücreler (a-c), karyoreksis (d-f) ve mikronükleus oluşumu (g-i) (ölçek: 10 μ m, x100 büyütme)



Görsel 3.4. PS-MP'lerine besin yoluyla maruz kalan *T. molitor* larval hemositlerinde tespit edilen apoptoz (a-b), erken apoptoz (c-d) ve nekroz (e-f) evreleri (ölçek: 10 μ m, x100 büyütme)

3.4. Hemosit Yayılması

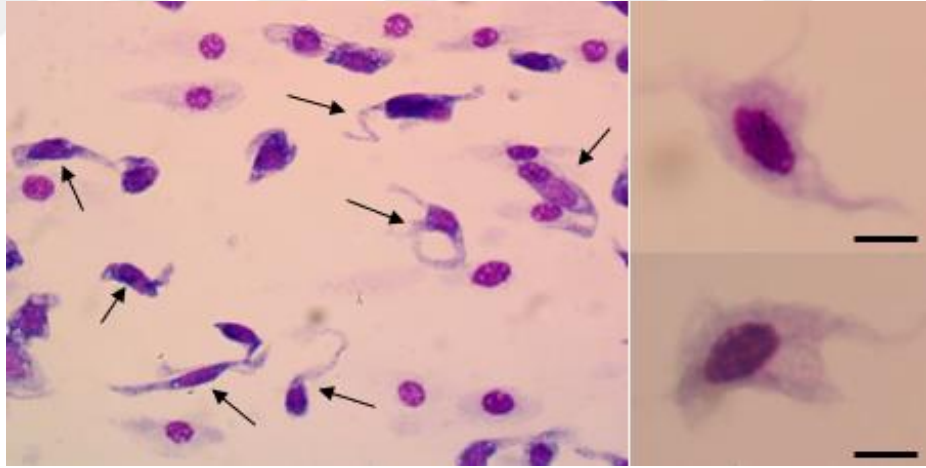
T. molitor larval hemositlerinin, larval besinle uygulanan PS-MP'nin artan dozlarına göre sergilediği fagositoz tepkisinin belirlenmesi için yapılan “hemosit yayılma” analiz sonuçları Şekil 3.3’de gösterilmektedir. Buna göre hemosit yayılma oranlarında PS-MP verilmeyen kontrol grubu ile artan dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmektedir ($\chi^2=154,292$; $df=4$; $p=0,000$). Hemosit yayılma oranlarının kontrol, 5, 10, 20 ve 40 mg/ml’ye göre sırasıyla $39\pm0,94$, $44\pm0,85$, $53\pm1,14$, $59\pm1,08$ ve $65\pm1,27$ olduğu tespit edildi. Hemosit yayılması uygulanan PS-MP dozlarına bağlı olarak düzenli bir artış gösterdi. Ayrıca *T. molitor* larvalarında yayılan hemositlere ait görüntüler Görsel 3.3’de gösterilmektedir.



Şekil 3.3. PS-MP dozlarının *T. molitor* larval hemositlerinin yayılma davranışlarında meydana getirdiği değişimler

* Her çubuk yüzdesel ortalama (%) ve standart hatayı ($\pm$) temsil eder.

* Önemli farklılıklar farklı harflerle belirtilmiştir (a-e) ($P < 0,05$; Kruskal Wallis H, Mann-Whitney U testi).

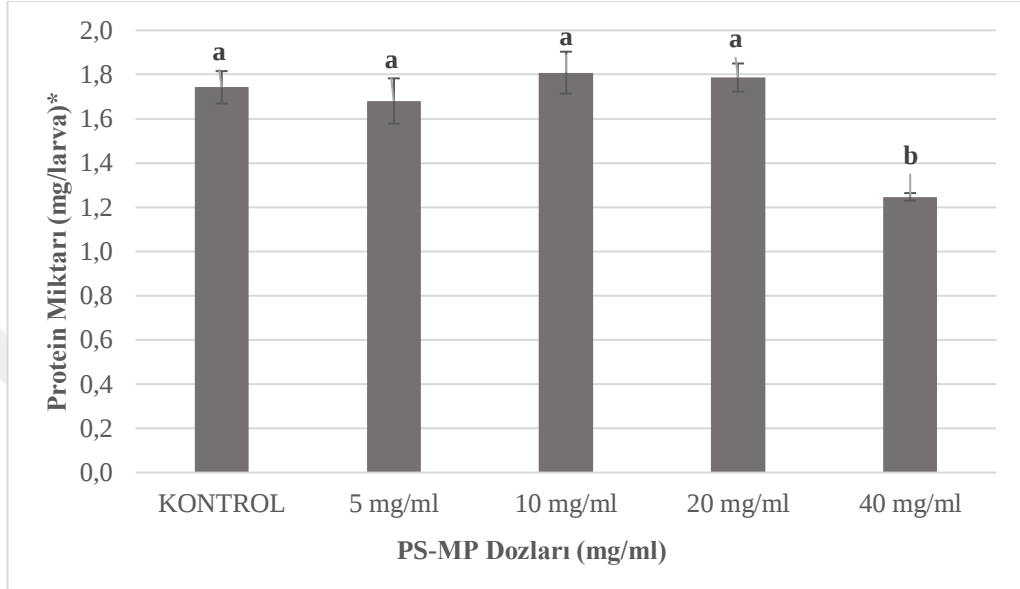


Görsel 3.5. *T. molitor* larval hemolenfinde yayılış gösteren hemositlerin mikroskopik görüntüleri (ölçek: 10 μ m; $\times 100$ büyütme)

3.5. Fenoloksidaz Enzim Aktivitesi

Fenoloksidaz (FO) spesifik aktivitesinin belirlenmesi için hem kontrol grubu larvalarının hem de artan PS-MP dozları ile beslenen larvaların hemolenfindeki toplam protein miktarı belirlendi. Toplam protein miktarı kontrol, 5, 10 ve 20 mg/ml doz grupları

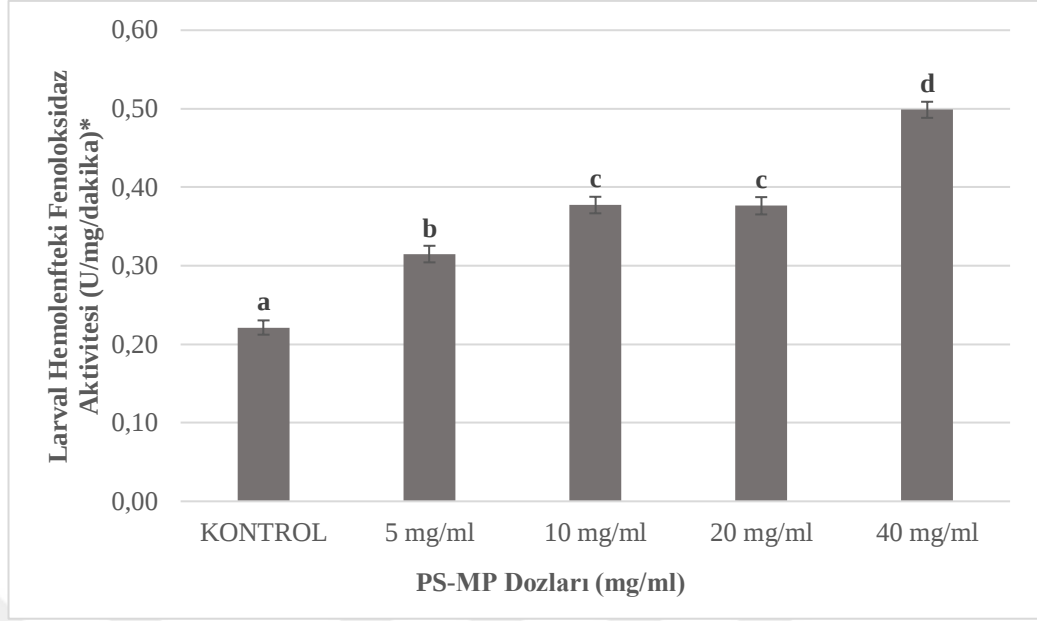
arasında sırasıyla $1,74 \pm 0,07$, $1,68 \pm 0,10$, $1,81 \pm 0,09$ ve $1,79 \pm 0,06$ mg/ml olarak belirlenirken bu gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. Larval hemolenfteki toplam protein miktarı, en yüksek doz grubu olan 40 mg/ml’de $1,25 \pm 0,02$ mg/ml değerinde belirlenerek diğer doz gruplarında anlamlı bir azalma gösterdi ($F=9,228$; $df=4, 35$; $p=0,000$) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. PS-MP artan dozlarının *T. molitor* larval protein miktarı üzerindeki etkisi

* Aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p < 0,05$; ANOVA, Tukey testi).

PS-MP dozlarının larvalardaki FO enzim aktivasyonu üzerindeki etkileri ise Şekil 3.5’te gösterilmektedir. Artan PS-MP uygulamasına bağlı olarak *T. molitor* larvalarının hemolenfindeki FO aktivitesinin kontrol grubuna göre artışa neden olduğu tespit edildi ($\chi^2=139,725$; $df=4$; $p=0,000$). En düşük FO aktivitesi $0,22 \pm 0,01$ U/mg protein/dakika olarak kontrol grubunda tespit edildi. FO aktivitesi 5 ve 10 mg/ml PS-MP doz aralığında sırasıyla $0,31 \pm 0,01$ ve $0,38 \pm 0,01$ U/mg protein/dakika olarak anlamlı bir artış gösterirken, 10 ve 20 mg/ml doz arasında sırasıyla $0,38 \pm 0,01$ ve $0,38 \pm 0,01$ U/mg protein/dakika olmak üzere anlamlı bir değişim görülmedi. En yüksek FO aktivitesi ise en yüksek doz grubu olan 40 mg/ml’de ($0,50 \pm 0,01$ U/mg protein/dakika) tespit edildi ve bu artış diğer doz gruplarına göre de önemlidir.

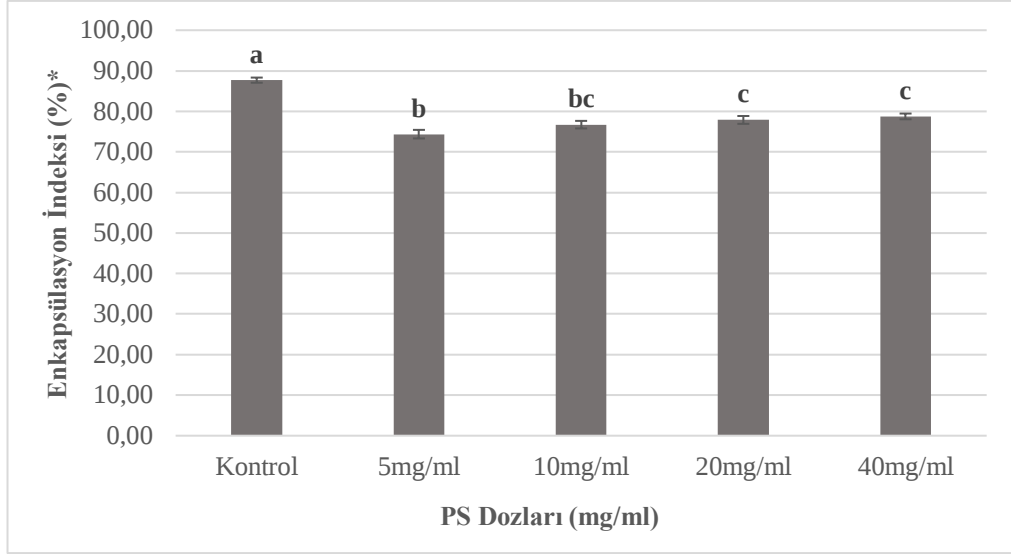


Şekil 3.5. PS-MP dozlarının *T. molitor* larval hemolenfindeki Fenoloksidaz (FO) aktivitesi üzerindeki etkileri

* Sütunlar üzerindeki farklı harfler (a-d) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,05$; Kruskal Wallis H, Mann-Whitney U testi).

3.6. Enkapsülasyon

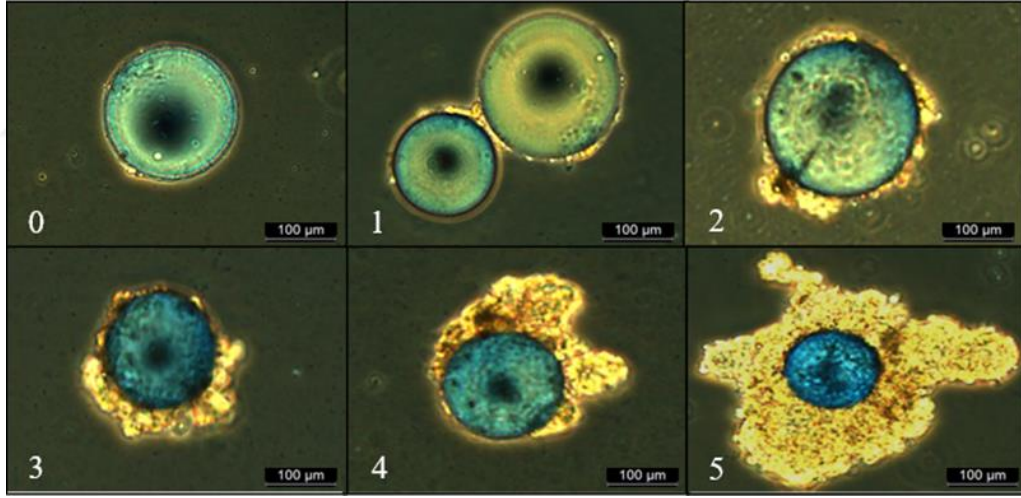
PS-MP dozlarına besin yoluyla maruz kalan larvalardan elde edilen *in vitro* enkapsülasyon indeksleri Şekil 3.6'de gösterilmektedir. Ayrıca *T. molitor* larval hemositlerinde belirlenen enkapsülasyon durumlarının mikroskopik görüntüleri Görsel 3.6'de sunulmaktadır. Deneysel analizlerden elde edilen verilerin analiz sonuçlarına göre larval hemositlerin enkapsülasyon tepkisi uygulanan PS-MP dozlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak belirgin bir azalma gösterdi ($F=37,323$; $df=4, 220$; $p=0,000$). En yüksek enkapsülasyon indeksi ($\%87,68\pm0,64$) PS-MP uygulaması yapılmayan ve sağlıklı larvalardan oluşan kontrol grubunda belirlendi. Doz grupları arasında en düşük enkapsülasyon indeksi ($\%74,37\pm1,06$) 5 mg/ml'de belirlendi. 10, 20 ve 40 mg/ml dozlarında ise enkapsülasyon indeksinin sırasıyla $\%76,71\pm0,93$, $\%77,88\pm0,97$ ve $\%78,74\pm0,71$ olduğu tespit edildi.



Şekil 3.6. PS-MP'lerine maruz bırakılan *T. molitor* larval hemositlerinin enkapsülasyon indeksi (%)

* Her çubuk yüzdesel ortalama (%) ve standart hatayı ($\pm$) temsil eder.

* Önemli farklılıklar farklı harflerle (a-c) belirtilmiş olup, sütunlar üzerinde aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p < 0,05$; ANOVA, LSD testi).



Görsel 3.6. Besinsel yolla PS-MP'ye maruz bırakılan *T. molitor* larval hemositlerinde belirlenen enkapsülasyon durumlarının faz-kontrast mikroskobu görüntüleri (Leica DM6000 B, $\times 10$ büyütme) (ölçek çubuğu=100 μ m). 0: enkapsülasyon yok; 1-2-3: zayıf enkapsülasyon; 4-5: güçlü enkapsülasyon

3.7. Genotoksisite

PS-MP'lerine besin yoluyla maruz bırakılan *T. molitor* larval hemositlerinde meydana gelen ve genotoksik etkinin göstergesi olan DNA hasarının belirlenmesi amacıyla Comet testi yapıldı. Elde edilen kuyruk uzunluğu (μ m), kuyruk yoğunluğu (%),

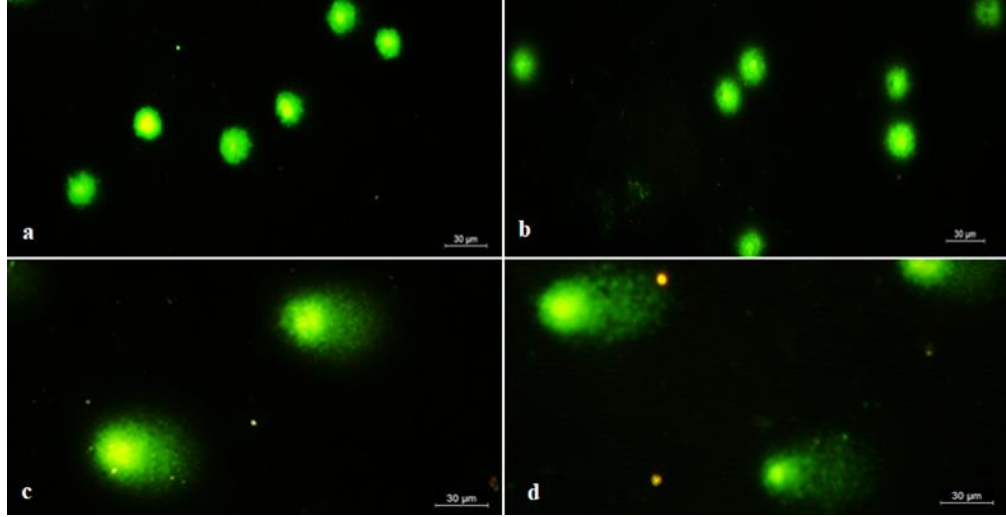
kuyruk momentı (μm) ve kuyruk göçü (arbitrary unit) parametrelerine ait veriler Şekil 3.7’de sunulmaktadır. Genel olarak, PS-MP uygulanan deney gruplarındaki larval hemositlerden elde edilen tüm Comet parametreleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermektedir ($p<0,05$). DNA hasarı meydana gelen *T. molitor* larval hemositlerinin mikroskopik görüntüleri ise Görsel 3.7’de gösterilmektedir.

En düşük kuyruk uzunluğu, PS-MP uygulaması yapılmayan kontrol grubunda görülürken ($39,36\pm0,32 \mu\text{m}$), en yüksek kuyruk uzunluğu $100,84\pm1,27 \mu\text{m}$ olarak en yüksek PS-MP dozu olan 40 mg/ml ’de belirlendi ($\chi^2=1955,52$, $df=4$, $p=0,000$). 5, 10 ve 20 mg/ml PS-MP dozlarında ise kuyruk uzunluğu sırasıyla $73,62\pm0,76 \mu\text{m}$, $75,67\pm0,72 \mu\text{m}$, $76,06\pm0,77 \mu\text{m}$ olarak belirlendi. Bu dozlar arasında düşük de olsa bir artış olurken, 40 mg/ml PS-MP uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden oldu (Şekil 3.7).

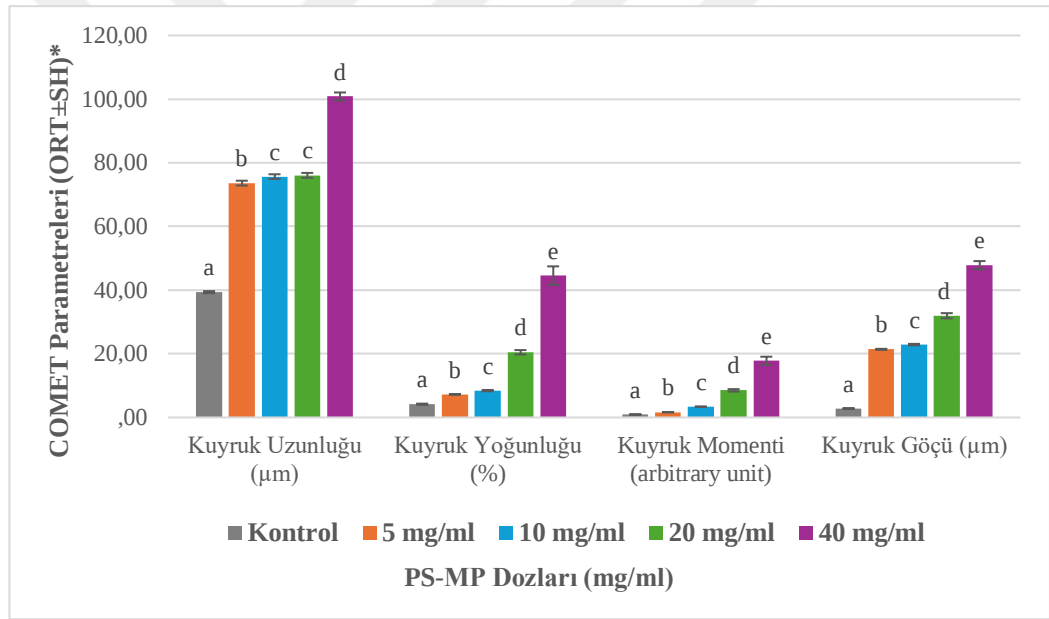
Larval hemositlerde belirlenen cometlerin kuyruk yoğunluğunun PS-MP uygulanan gruplarda hem kontrole göre hem de doz artışına bağlı olarak önemli artış gösterdiği tespit edildi ($\chi^2=1546,69$; $df=4$; $p=0,000$). En düşük kuyruk yoğunluğu $\%4,16\pm0,19$ olarak kontrolde görülürken, bu değer 40 mg/ml PS-MP grubunda 10 kat artarak $\%44,58\pm2,89$ belirlendi. 5, 10 ve 20 mg/ml doz gruplarındaki kuyruk yoğunlukları ise sırasıyla $\%7,24\pm0,13$, $\%8,44\pm0,20$ ve $\%20,48\pm0,69$ olarak belirlendi (Şekil 3.7).

Larval hemositlerin comet analizinden belirlenen kuyruk momentı verilerinde kontrol grubuna göre ($0,91\pm0,04$) artan PS-MP dozlarında belirgin bir artış olduğu belirlendi. PS-MP dozlarından 5, 10, 20 ve 40 mg/ml dozları için kuyruk momentinin sırasıyla $1,63\pm0,03$, $3,37\pm0,10$, $8,52\pm0,38$ ve $17,80\pm1,27$ olarak kademeli bir artış gösterdiği de belirlendi ($\chi^2=2285,17$; $df=4$; $p=0,000$) (Şekil 3.7).

Comet analizlerinden elde edilen kuyruk göçü değerleri de kontrol grubuna göre ($2,80\pm0,10 \mu\text{m}$) 5 mg/ml ($21,39\pm0,16 \mu\text{m}$), 10 mg/ml ($22,90\pm0,22 \mu\text{m}$), 20 mg/ml ($31,95\pm0,81 \mu\text{m}$) ve 40 mg/ml PS-MP ($47,84\pm1,28 \mu\text{m}$) doz gruplarında belirgin bir artış gösterdi. Belirlenen bu istatistiksel artış doz grupları arasında da devam etmektedir ($\chi^2=2148,92$; $df=4$; $p=0,000$) (Şekil 3.7).



Görsel 3.7. COMET analizine ait SYBR Green ile boyanmış *T. molitor* larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri (Leica DM6000 B, x40 büyütme) (ölçek çubuğu=30 µm). (a-b): DNA hasarı olmayan hemositler; (c-d): DNA hasarı olan hemositler



Şekil 3.7. PS-MP 'lerinin farklı dozlarının *T. molitor* larval hemositlerindeki Comet parametrelerine etkisi

* Tüm parametreler ortalama (ORT, ±) ve standart hatayı (SH) göstermektedir.

* İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar farklı harflerle gösterildi (a-e) ($p < 0,05$; Kruskal Wallis H, Mann Whitney U testi).

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Plastik kirliliği günümüzde önemli bir çevresel sorun haline gelmekle birlikte, özellikle sanayi devriminden bu yana giderek artması ile geri dönüşüm mekanizmalarının yetersiz kalması, bu polimerlerin büyük bir çevresel tehdit oluşturmasını sağlamıştır. Yapılan araştırmalarda dünya genelinde her yıl milyonlarca ton plastiğin üretildiği ve bu plastiklerin özellikle çevresel faktörlerin etkisiyle MP formlarda karasal ve sucul ekosistemlere taşınmasıyla buralarda biriktiği belirlendi. MP'ler boyutları nedeniyle hem dokulara nüfuz ederek hem de besinsel yollarla sucul canlılarla birlikte insanların ve diğer canlıların besin zincirine karışmaktadır. Bunun yanında küçük boyutları sayesinde atmosfere de karışması bulunduğumuz her ortamda MP maruziyetini kaçınılmaz kılmaktadır. MP'lerin canlılar üzerindeki uzun süreli etkileri henüz tam olarak anlaşılmasa da yapılan çalışmalar ile bu maddelerin immünotoksik ve nörotoksik etkilerinin olduğu, metabolik sorunlara ve insanlarda solunum yolu rahatsızlıklarına neden olduğu görüldü.

Doğada en yaygın görülen plastik kirleticilerinden biri olan PS, ambalaj, yalıtım ve gıda paketlenmesinde karşımıza çıkar. Hidrofobik yapısı ve termoplastik formda olması ile biyolojik yollarla parçalanması zor ve yavaş gerçekleşir. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerin etkisiyle PS-MP'lerine dönüşerek zaman içerisinde çevrede birikime uğrar. Ayrıca PS-MP'leri ile birlikte kanserojenik etkiye sahip olduğu düşünülen stiren monomerlerinin de taşındığı bilinmektedir (Pilevar vd., 2019). Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı karasal böcek türlerinin PS gibi çeşitli plastikleri sindirebildiği ve besin olarak tüketebildiğini ortaya çıkarmıştır. Böylece böceklerin MP'lerin çevresel sürdürülebilirliği kapsamında mikroorganizmalardan ve mantarlardan daha ekonomik ve hızlı bir ayrıştırma sürecini sağladığı anlaşılmıştır. Ancak yapılarında poliklorlu bifeniller (PCB), poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) ve ağır metaller gibi kimyasal kirleticileri ve toksik maddeleri taşıma özelliği olan MP'lerin, ekosistemde ayrıştırıcı, tozlaştırıcı ve besin kaynağı olarak önemli rolleri olan böceklerin metabolizması ve bağışıklık mekanizması üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği düşünülmektedir (Shen vd., 2023). Bu konuyla ilgili literatürde yer alan çalışmaların sayısı kısıtlı olmakla birlikte *T. molitor* gibi “ekonomik-faydalı” böceklerin bu gibi kirleticilerden nasıl etkilendiğinin araştırılması önemlidir.

Böcekler doğuştan gelen bağışıklık sistemine sahiptir. Bu tür bağışıklıkta hastalık yapıcı etkene karşı hızlı bir savunma yanıtı oluşturulur. Bu sistem humoral ve hücrel

mekanizmaların kombinasyonundan oluşur. Her iki mekanizmada da hemolenfte bulunan hemositler temel rol oynar. Humoral bağışıklık AMP'lerin üretilmesi, pıhtılaşma ve melanizasyon ile sonuçlanan bazı enzimatik kaskadların oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Hücresel bağışıklık ise hemositlerin (plazmatosit, granülosit, önositoid ve prohemosit) patojen veya yabancı maddeleri fagosite ederek, kapsül veya nodül oluşturarak uzaklaştıma süreçlerini kapsamakla birlikte bazı hücre içi sinyal mekanizmalarının tetiklenerek bağışıklık yanıtının düzenlenmesini de kapsar. Her iki savunma mekanizması birbiriyle koordineli olarak gerçekleşir (Lavine ve Strand, 2002; Hillyer, 2016).

Yukarıda verilen bilgiler ışığında gerçekleştirilen bu çalışmada PS-MP'lerine maruz kalan *T. molitor* larval bağışıklığı üzerindeki immünotoksik etkilerin anlaşılması için toplam hemosit sayımı (THS), farklı hemosit sayımı (FHS), hücre yayılması, toplam protein analizi, fenoloksidaz enzim aktivitesi, enkapsülasyon ve comet testi ile DNA hasarı incelendi. Buna ek olarak PS türü mikropplastik maddelerin larval gelişim biyolojisi üzerindeki etkileri de belirlendi.

Biyolojik gözlem ve gelişim deneyi bulguları, larval besin içine test edilen dozlarda homojen olarak eklenen PS-MP'nin *T. molitor* larvalarının gelişim evrelerini (larva-pupa-ergin) tamamladığını göstermektedir. Bu veriler, larvaların PS gibi plastik kaynakları tüketme yeteneğinin kepek ve vitamin gibi ek besinler ile desteklendiğinde devam ettiği, böylece hayatta kalabildiklerini ve gelişim evrelerini tamamlayabildiklerini göstermektedir. PS-MP (1 µm) ile beslenen larvaların test edilen dozlar arasındaki hayatta kalma oranı (SR) ise kontrole kıyasla ortalama %92'dir. Sonuçlarımıza benzer olarak *T. molitor*'da plastik biyodegradasyon mekanizmasının anlaşılması için yapılan önceki çalışmalarda da PS plastik yedirilen larvalarda SR oranları %80-90 olarak belirlenmiştir (Yang vd., 2015a; Yang vd., 2018a; Peng vd., 2019; Matyja vd., 2020; Yang vd., 2021; Pinchi vd., 2022; Di Liberto vd., 2024). Her ne kadar plastik tüketiminin larvaların yaşamını sürdürmesi için gerekli enerjiyi üretmesine katkı sağladığı bilinse de larvaların ağırlık kazanmasına katkısının olmadığı yapılan bu çalışmada da ortaya konuldu. PS-MP dozlarıyla beslenen larvaların ağırlık kazanımı kepek + maya-vitamin ile beslenen larvalara göre azaldı. Böceklerde plastik biyodegradasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda da benzer sonuca ulaşılmıştır (Brandon vd., 2018; Peng vd., 2019; Jiang vd., 2021; Matyja vd., 2020; Bulak vd., 2021; Pinchi vd., 2022; Di Liberto vd., 2024). Diğer yandan LYS ve PYS'nin PS-MP doz gruplarında kontrole kıyasla arttığı ancak doz grupları arasında PYS'de bir değişiklik olmadığı görüldü. Bu sonuçlar 1 µm boyutundaki PS-MP

uygulamasının *T. molitor* larval ve pupal gelişimini yavaşlattığına işaret etmektedir. Böcekler genel olarak temel enerji kaynağını yağ gövdesinde (fat body) depoladıkları lipitlerden elde etmektedirler (Renault vd., 2002; Matyja vd., 2020). Ayrıca protein ve lipit metabolizmasının fizyolojik süreçleri düzenleyerek çoğu hormon ve enzimin temel yapısını oluşturduğu da bilinmektedir. Dolayısıyla larvaların lipit ve protein metabolizmasında meydana gelebilecek değişiklikler ve özellikle düşük boyutlarda PS-MP (1 µm) maruziyetinin oksidatif stresi tetikleyebilecek olması (Turna vd., 2022), böceğin biyolojik gelişimini ve ağırlık kazanımlarını da etkileyebilir. Bu nedenle biyolojik gelişime yönelik verilerimiz larvaların gelişim süreçlerini dengeli tamamlayabilmeleri için gerekli besin ve enerji kaynağının kalitesinin PS-MP nedeniyle azalmasından ve stres faktörü oluşturmamasından kaynaklı olduğuna işaret etmektedir. Sonuçlarımızdan farklı olarak bazı çalışmalarda PS yedirilen *T. molitor* larvalarının ağırlık artışında belirgin bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (Yang vd. 2015; Muhammad vd., 2021; Putra ve Nurcahyasari, 2021). Yang ark. (2015a)'nın yaptığı çalışmada da PS ile beslenen *T. molitor* larvalarının pirinç kepeği ile beslenen kontrol grubu larvalarına göre belirgin bir ağırlık kazanımı olmadığı görülmüştür. Bu durumun nedeni plastik biyodegradasyonunda temel rol oynayan bağırsak bakterilerinin faaliyetleriyle *T. molitor* larvalarının PS'i tüketmesi ve büyümek için gerekli enerjiyi sağlaması yönünde olduğu ifade edilmiştir. Buna rağmen başka bir benzer çalışmada sadece PS diyeti ile beslenmenin larvaların büyümesi üzerinde olumsuz etkiye neden olduğunu ve tek karbon (C) kaynağı olarak yeterli enerjiyi sağlamadığı öne sürülmüştür (Zhong vd., 2022). Elde edilen bu farklı veriler mikroplastik tüketiminin *T. molitor* gibi karasal böceklerin gelişim metabolizmasında etkili olduğunu ancak bu etkinin olumlu ya da olumsuz olduğunu kesinleştiren sonuçlar hala tartışılmaktadır. Ancak hem çalışma verilerimiz hem de daha önce yapılan tüm çalışmalar MP çeşitliliğine, boyutuna, miktarına ve organizmanın türüne göre biyolojik etkilerin de değişiklik gösterdiğine işaret etmektedir. Bu nedenle farklı tür ve boyutlardaki mikroplastiklerin karasal böceklerin gelişim fizyolojisi üzerinde ne gibi etkiler meydana getirdiğinin anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

T. molitor larvalarının beslenme dönüşüm parametrelerinden FCR değeri, yutulan besinin ne kadarının biyokütleyle katıldığını gösteren önemli bir parametredir (Bordiean vd., 2021). Böceklerde omurgalı hayvanlara kıyasla belirlenen düşük FCR değerleri artan verimlilikle ilişkilidir (Bordiean vd., 2021). Bu da böcek larvalarının az besin ile yüksek

biyokütleyle sahip olması anlamına gelmektedir. Larval besini biyokütleyle dönüştürme oranı un kurdu yetiştiriciliğinde çok önemlidir. Daha kısa yaşam süresi genellikle daha iyi bir FCR ile ilişkilidir ve çiftçilerin tüketilen yem birimin başına daha fazla protein kaynağı üretmesini sağlar. Çalışmalar, un kurtlarının uygun biyotik ve abiyotik koşullarda yetiştirildiğinde yaklaşık 3,61'lik bir FCR'ye ulaşabileceğini göstermiştir (Oonincx vd., 2015). Çalışmamızda da kontrol larvalarından elde edilen benzer FCR değeri (4,00) yetiştirme koşullarımızın uygun olduğunu göstermektedir. Deneysel gruplardan elde edilen veriler ise FCR değerlerinin PS-MP (1µm) doz uygulaması yapılan gruplar arasında azaldığını ve tüm gruplarda optimal olarak kabul edilen 3,61'in altında olduğunu gösterdi. Özellikle en düşük FCR değerinin en yüksek PS-MP doz grubunda olduğu tespit edildi. Bu durum larval gelişim sürecinin uzaması ve ağırlık artışının yüksek dozlarda azalmasının besin kalitesiyle olan ilişkisini açıklamaktadır. Ancak FCE'de kontrol ve dozlar arasında belirgin bir farklılık belirlenmedi. FCR ve FCE arasında genellikle negatif bir ilişki vardır (Bordiean vd., 2021). Bu nedenle FCE değerlerinin değişiklik göstermemesi MP maruziyetinin besin dönüşüm verimliliğini olumsuz etkilediğine işaret etmektedir. Broekhoven vd. (2015), un kurdu larvalarının besin içeriğinde sindirilmesi zor veya toksik olabilecek bileşiklerin varlığının FCE değerlerini etkileyebileceğini belirtmiştir. Bu nedenle PS-MP'leri gibi çevresel atıkların model böcek *T. molitor* gibi diğer karasal böceklerde biyokütle ile ilişkili metabolik faaliyetlerde etkili olabileceği çalışmamız sonuçlarıyla da desteklenmektedir. Ayrıca sarı un kurdu larvaları yem ya da besin kaynağı olarak ekonomik-faydalı böcek kapsamında pilot ve endüstriyel ölçekli böcek çiftliklerinde de üretilmektedir. Üretim sistemlerinde benzer MP'lere maruziyet FCR gibi beslenme parametrelerini de olumsuz etkileyebileceğinden hem ekonomik hem de sağlıklı larva yetiştiriciliğinde önemli bir durumdur. Özetle MP gibi çevresel ve toksik etkileri olan atıkların böceklerin büyüme ve gelişme parametrelerinin yanında beslenme parametrelerindeki etkilerinin de anlaşılması için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

THS'nin belirlenmesi, çevresel kirleticilerin böceklerin hücresel bağışıklığı üzerindeki etkilerinin bilinmesi için önemli bir parametredir (Altuntaş vd., 2012; Lavine ve Strand, 2002). Sonuçlarımız larval hemolenfte dolaşım halinde olan hemosit miktarının PS-MP (1µm) dozlarının artışından etkilendiğini göstermektedir. Özellikle 20 ve 40 mg/ml olan PS-MP dozlarına maruz kalan un kurdu larvalarının hemolenfindeki toplam hemosit seviyesinin yükseldiği belirlendi. *Galleria mellonella* larvaları ile yapılan başka bir çalışmada da sonuçlarımıza benzer olarak yapay besinle birlikte düşük

yoğunluklu polietilen (PELD) plastiğine maruz bırakılan larvalarda plastik maruziyetinin THS seviyesinde artışa neden olduğu belirlenerek bu durumun önemli bir bağışıklık tepkisine işaret ettiği ifade edilmiştir (Elmekawy vd., 2023). Hemolenfteki toplam hemosit yoğunluğunun değişmesinde hemositlerin mitotik aktivitesinin de etkili olduğu bilinmektedir (Gardiner ve Strand, 2000). Un kurdu larval hemolenfinde dolaşım halinde olan hemositlerin mitotik indeks verilerinin de ml'deki hemosit sayısı gibi PS-MP doz artışına paralel olarak arttığı belirlendi. Bu durum THS'deki artışın mitotik indeks ile bağlantılı olabileceğine ve test edilen PS-MP'nin mitozu aktive ederek hemosit sayısında değişikliğe neden olabileceğine işaret etmektedir. Buna karşın PS ve PET mikroplastikleri ile TiO₂ (titanium dioksit) nanopartiküllerinin *Partamona helleri* (iğnesiz arı) üzerindeki etkilerine bakılan bir çalışmada PS-MP maruziyetinin THS'de azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bu durum araştırmacılar tarafından hemolenfteki toplam hemosit seviyesinin tür farklılığına, MP boyutuna ve alım dozlarına göre değişebileceği yönünde yorumlanmıştır (Viana vd., 2023). Dora ve ark. (2021)'nin *Porcellio scaber* (tahta biti)'i farklı konsantrasyonlarda (%0,05, 0,5 ve 1,5) kauçuk ve polyester elyaf bazlı mikroplastiklere maruz bıraktığı çalışmada %0,05 konsantrasyondaki kauçuk bazlı mikroplastiklerin hemolenfteki THS oranında önemli bir artışa neden olduğu görülmüştür. Böylece mikroplastik maruziyetinin düşük konsantrasyonlarda bile bağışıklıkla ilgili parametreleri etkileyebileceği ifade edilmiştir (Dora vd., 2021). Daha önce yapılan çalışmalar ile benzer nitelikte olan larval hemolenfin ml'sindeki artan toplam hemosit sayısına yönelik bulgularımızın, besinle alınan küçük boyutlu PS-MP'lerinin uygulanan doz artışına bağlı olduğunu ve böylece model böcek *T. molitor* larvalarındaki hücresel bağışıklık sistemini indüklediğine işaret etmektedir.

Literatürde kısıtlı olarak verilen araştırmalara benzer olarak bu çalışmada da *T. molitor*'da prohemosit, granülosit, plazmatosit ve önositoid olmak üzere dört çeşit hemosit tipi karakterize edildi (Vommaro vd., 2021; Belal ve Gad, 2023). Belirlenen hemosit tiplerinde de yine benzer olarak plazmatosit ve granülosit oranının yüksek olduğu görüldü. Çalışmamızda besinle yüksek dozda düşük boyutlu PS-MP'ye maruz kalan deneysel gruplarda ise larval hemolenfte dolaşım halinde olan plazmatosit oranında artışın, granülosit oranında ise azalmanın olduğu belirlendi. Hemositler aracılığıyla gerçekleştirilen fagositoz tepkisinde plazmatositlerin granülositlerden daha fazla rol aldığı bilinmektedir (Lavine ve Strand, 2002). Böcek hemositlerinin fagositoz davranışlarının incelendiği bir çalışmada enjekte edilen mikro boncukların fagositozunda

rol oynayan hücrelerin çoğunlukla plazmatositler olduğu ortaya konmuştur (Ling ve Yu, 2006). Bu durum çalışmamızda 1 µm boyutundaki PS-MP'nin artan dozlarına bağlı olarak larval hemolenfteki artmış plazmatosit oranını destekler niteliktedir. Plazmatosit yüzdesinin yüksek dozlardaki artışı ise PS-MP'lerine karşı oluşturulan güçlü fagositoz tepkisine işaret etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda besinle birlikte sindirilen PS-MP'lerin veya diğer MP'lerin bağırsak lümeninden farklı dokulara ve dolaşım sistemine geçiş yaptığı ve bağırsak duvarında hücrel hasara neden olduğu midye (Von Moos vd., 2012), balık (Tanaka, K. ve Tanaka, H., 2016), sıçan (Deng vd., 2017) ve böcekler (Al-Jaibachi vd., 2018) gibi bazı hayvan modellerinde gösterilmiştir. Özellikle *Drosophila* larvalarında yapılan çalışmada besinle verilen 4 µm PS-MP'nin 10 ve 20 µm olanlara göre bağırsak bariyerinden daha fazla hemolenfe geçiş yaptığı ve SOR seviyesini artırarak oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir (Turna vd., 2022). Bu çalışmada da un kurdu larvasının hemolenfindeki plazmatosit ve granülosit gibi hemositlerin seviyesinde elde edilen veriler, besinsel yolla maruz kalınan düşük boyutlardaki MP'lerin doza bağlı olarak böceklerin bağırsak bariyerinden hemosöle geçebildiğine, hemolenfteki plazmatosit aracılı fagositoz yanıtını tetikleyerek SOR seviyesini artırabileceğine ve dolayısıyla oksidatif strese neden olabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle immünohistokimyasal yöntemlerle PS-MP varlığının hem bağırsak epitelyumunda hem de hemoseldeki varlığının araştırılması gerektiğini öneriyoruz.

1 µm boyutundaki PS-MP'lerine maruz kalan larvalarda granülosit yüzdesindeki azalma enkapsülasyon tepkisindeki azalmaya yönelik elde ettiğimiz verilerimizle bağlantılı olabilir. Çünkü, böcek hemolenfinde güçlü enkapsülasyon tepkisini ortaya çıkaran faktörler hemolenfteki granülosit yoğunluğunun da artışına neden olabilir (Pech ve Strand, 1996; Yu ve Kanost, 2004; Cho, Y. ve Cho, S., 2019). Boyut küçük olduğu için enkapsülasyon yerine fagositoz indüklenmiş olabilir. Genel olarak hemolenfte dolaşımda bulunan granülositler fagosit edilemeyecek olan büyük yabancı maddelerin etrafını sararak kapsül oluşturmayı başlatmaktadır (Lavigne ve Strand, 2002; Urbanski vd., 2018; Vigneron vd., 2019). Bu nedenle, test edilen PS-MP dozlarına bağlı olarak plazmatositler artarken, granülositlerle birlikte enkapsülasyon tepkisinin azalması MP boyutunun önemini bir kez daha ortaya çıkarmaktadır. Diğer yandan, larval besinle birlikte verilen PS-MP dozlarının granülositlerin farklılaşmasında rol oynayan metabolik yollarda olumsuz etkiye neden olmuş olabilir. Larval hemolenfte sirküle halde olan önositoit oranının yüksek dozda PS-MP'ye maruz kalan larvalarda artmış olması ise, PS-

MP'nin düşük boyutlarda larval immün sistemi etkilediğine ancak bu etkinin farklı savunma mekanizmaları üzerinden gerçekleştiği düşüncemizi destekler niteliktedir. Benzer bir sonuç ZnO-NP (çinko oksit nanopartikülleri) gibi daha küçük boyutlardaki maddelerle yapılan başka bir çalışmada da bildirilmiştir. Bu NP'lere maruz kalan *Bombyx morii* (ipek böceği) larval hemolenfinde kontrole kıyasla granülosit oranında azalma olurken önositoid oranında önemli bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir (Belal ve Gad, 2023). Ek olarak 40 mg/ml PS-MP dozundaki önositoit artışı FO enzim aktivitesinde belirlediğimiz artış ile ilişkili olabilir. Çünkü önositoitlerin FO enziminin öncüsü olan proFO'yu sentezlediği ve böylece humoral bağışıklığın önemli bir bileşeni olan melanizasyon tepkisinin gerçekleşmesini sağladığı bilinmektedir (Barnes, 2000; Lavine ve Strand, 2002; Vigneron vd., 2019). Yüksek dozda artan önositoit yüzdesinin artmış FO enzim aktivasyonu ile sonuçlanmasının PS-MP maruziyetinin *T. molitor* immün sisteminde fagositoz ve melanizasyonla ilişkili hücresel ve humoral mekanizmaları tetiklediğine işaret etmektedir. PS-MP maruziyetine bağlı görülen bu hücresel değişimler böceğin büyüme ve gelişimi sırasında karşılaştacağı stres koşullarında gerekli fizyolojik dayanıklılık için önemli bir sorun teşkil edebilir. Özellikle hemolenfteki artan ya da azalan hemositler stres koşulları altında gereken hücresel ve humoral immün savunma tepkilerinin belirli bir fizyolojik dengede ortaya çıkmasında olumsuz etki ortaya çıkarabilir. Plazmatosit, granülosit ve önositoit yüzdesinde meydana gelen değişikliklere karşın artan dozlarda 1 µm boyutundaki PS-MP'sine besin yoluyla maruz kalan larvaların prohemosit yüzdesinde hem kontrol hem de doz grupları arasında belirgin bir değişiklik olmadığı görüldü. Prohemositlerin diğer hücrelere farklılaşan kök hücreler olduğu bilinmektedir (Lavine ve Strand, 2002; Strand, 2008). Plazmatosit, önositoit ve mitotik indekste artışa bakıldığında PS-MP toksisitesine bağlı olarak prohemositlerin bağışıklık yanıtını güçlendirmek için düzenli olarak farklılaştığını ve bu şekilde hemolenfte bulunma sıklığını koruduğunu düşündürmektedir. Prohemositler hakkında az bir bilgiye sahip olunması nedeniyle bu hemositlerin böcek bağışıklığındaki rolleri ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Toksik etkiye neden olan yabancı maddelere ve enfekte edicilere karşı böcek hemositlerinde hasar görmüş hemositlerin apoptoz (programlanmış hücre ölümü) ve nekroz mekanizmaları ile ölümünün sağlandığı bilinmektedir (Pech ve Strand, 2000). Böylece hastalık yapıcı etkenler ortadan kaldırılarak immün yanıt oluşturulur. Ayrıca apoptotik hücrelerde morfolojik olarak küçülme, kromatin yoğunlaşması ve DNA

parçalanması gibi değişiklikler görüldüğü de daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Pech ve Strand, 2000; Gwokyalya ve Altuntaş, 2019). Daha önce yapılan bir çalışmada strafor formda PS yedirilen *T. molitor*'da apoptotik hücre oranında artış gözlenmiştir (Zielinska vd., 2021). Benzer olarak, 1 µm boyutundaki PS-MP'nin *T. molitor* larval hemositlerde apoptoz ve nekrozla ilişkili olabilecek anormal hücre oranlarında artışa neden olurken, özellikle apoptotik hücre oranının yüksek doz olan 40 mg/ml'de azaldığı görüldü. Verilerimiz, düşük boyutlu MP'nin immün savunmayı etkilerken sitotoksositeye de neden olduğunu göstermektedir. Dozlar arasında apoptotik hücre oranının en yüksek PS-MP dozu olan 40 mg/ml'de azalma göstermesinin nedeni ise artan DNA hasarıyla veya hemositlerdeki nekrotik hasarın artmasıyla ilişkili olabilir. Çünkü daha önceki bir çalışmada hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde ya apoptoz ile hücrenin ölüme gittiği ya da bu hasara karşı tolerans göstererek mutasyonlu bir genomla yaşamına devam ettiği öne sürülmüştür (Asaithamby ve Chen, 2011). Apoptotik ve nekrotik yollarla ilişkili olan sitotoksik etkinin biyokimyasal ve moleküler detaylarının incelenmesi önemlidir.

Çalışmamızda PS-MP'lerine maruz kalan larval hemositlerde hücre çekirdeğinde hasar meydana gelmiş ve genotoksitenin göstergesi olan bazı anormal hücre oluşumları da gözlemledik. Belirlenen anormal hemositler, daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen hücre görünümleri olan karyoreksis, dev çok çekirdekli hemosit ve vakuollü hemositlerle benzerlik göstermektedir (Jones ve Tauber, 1954; Markus vd., 2015; Cinege vd., 2019; Gwokyalya vd., 2022). Hücre çekirdeğindeki bu hasarlar, mitoz bölünmenin sitokinez aşamasında engellenmesi (Hao vd., 2018) veya birden fazla hücrenin füzyonu (Markus vd., 2015; Cinege vd., 2019) nedeniyle meydana gelmektedir. Markus vd., (2015) dev çok çekirdekli hücre tiplerini (giant multinucleated hemocytes, GMH) bir *Drosophila* cinsinde parazitlenmeden sonra keşfettiklerini ve bu hücrelerin enkapsülasyonda görev alan bağışıklık hücreleri olduğunu ifade etmişlerdir. Karyoreksis ise başka bir çalışmada apoptoz sırasında hücre çekirdeğinin küçülüp yoğunlaştığı piknozu takiben nükleer kompleksin parçalanıp düzensiz bir şekilde sitoplazmaya dağıldığı durum olarak ifade edilmiştir (Zamzami ve Kroemer, 1999). Konak-parazitoid ilişkisinin incelendiği çalışmada karyoreksis oluşumu ve “dev çok çekirdekli hücreler” olarak nitelendirilen anormal hemositler genotoksite göstergesi olarak tanımlanmış olup, konak bağışıklığının değiştirilmesiyle birebir ilişkili bir durum olarak değerlendirilmiştir (Gwokyalya vd., 2022). Başka bir çalışmada fizyolojik ve toksikolojik stres altında vakuol oluşumu, düzensiz hücre şekilleri (anormal) ve parçalanmış çekirdeğe

(karyoreksis) sahip hücreler olarak karakterize edilen hemositler *T. molitor* larval hemolenfinde belirlenmiştir (Jones ve Tauber, 1954). PS-MP'nin hemositlerde karyoreksis ve dev çok çekirdekli hücre oluşumlarını tetiklemesi azalan enkapsülasyon tepkisiyle ilişkili olan ve normal hücre görünümündeki granülositlerin azalmasından da sorumlu olabilir. Yine PS-MP maruziyetinin neden olduğu vakuollü ve düzensiz hücre şekilleri ise sitotoksositeyle ilişkili olan apoptotik tepkinin artışıyla bağlantılı olabilir.

Bu parçalanma tespit ettiğimiz hücrelere benzer olarak çoğu zaman koyu renkli kromatin parçaları şeklinde görünebilmektedir. Büyük boyutlardaki plastiklerin böcek bağışıklığındaki etkisinin incelendiği bir çalışmada ise düşük yoğunluklu polietilen (PELD) plastiklerine maruziyetin *G. mellonella* larvalarında farklılaşmış, vakuolleşmiş ve düzensiz çekirdeğe sahip hemosit morfolojisine neden olduğu bildirilmiştir (Elmekawy vd., 2023). Bununla birlikte, dokulardan geçebilen daha küçük boyutlu NP'lere maruz kalmanın da böcek hemositlerinde yapısal (vakuolizasyon, sitoplazma azalması, çekirdek yoğunlaşması, düzensiz ve parçalanmış hücre çeperi) değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (Gad, 2020; Belal ve Gad, 2023). Model böcek *T. molitor* larval hemositlerinde ilk defa elde ettiğimiz benzer bulgular da 1 µm boyutundaki PS-MP'nin kronik maruziyetinin canlıda sitotoksik ve genotoksik etkilere neden olduğunu desteklemektedir. Anormal hücre oluşumları olarak değerlendirilen verilerimize mikronükleus oluşumu tespit edilen hemositler de dahil edilmiştir. Çeşitli ksenobiyotiklerin böceklerde immünotoksik etkilerinin belirlendiği çalışmalarda diğer bağışıklık yanıtlarıyla birlikte mikronükleus oluşumu da genotoksik hasarın göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Avio vd., 2015; Gwokyalaya ve Altuntaş, 2019; Altuntaş vd., 2020; Eskin ve Bozdoğan, 2022). Bu nedenle tespit edilen apoptotik, nekrotik ve anormal hücre oluşumları, PS-MP maruziyetinin hem boyuta hem de doza bağlı olarak *T. molitor* larval hemositlerinde genotoksositeye neden olduğunu ve böcek bağışıklık tepkilerini değiştirdiğini göstermektedir.

Fagositoz, temelde plazmatosit ve granülosit hücrelerinin faaliyetiyle gerçekleşen ve önemli bir hücrel bağışıklık tepkisidir. Fagositozun belirteci olan hücre yayılmasına yönelik bulgularımız, larval hemolenften elde edilen hücrelerin yayılma kabiliyetinin PS-MP doz artışından etkilenecek arttığını gösterdi. Ayrıca yayılma eğilimi gösteren hücrelerin çoğunlukla plazmatositler olduğu gözlemlendi. Bu durum PS-MP maruziyetine bağlı olarak artan plazmatosit oranını da desteklemektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, fagositoz tepkisinin ortaya çıkmasında plazmatositlerin

granülositlerden daha aktif rol aldığı rapor edilmiştir (Ling ve Yu, 2006). Bununla birlikte Lepidoptera cinsinden izole edilen PSP1 (plazmatosit-spreading peptit)'in plazmatositlerin yayılma hızını artırdığı ancak granülositlerin yayılmasını engellediği bildirilmiştir (Strand ve Clark, 1999; Volkman vd., 1999). Bu nedenle hemolenfte 1 µm boyutundaki PS-MP'nin varlığı hemositlerin yayılmasını düzenleyen peptit profillerini etkileyerek granülositlerin yayılma kabiliyetinin azalmasına neden olmuş olabilir. Doz artışına bağlı olarak yayılan plazmatosit oranında görülen artış ise PS-MP'nin larval hemositleri fagositoz yapmaya teşvik ettiğine ve böylece bağışıklık yanıtı oluşturulduğuna işaret etmektedir.

Böceklerde hücrel savunmanın başka bir göstergesi de enkapsülasyondur. Vücuda giren ve fagosit edilemeyecek kadar büyük olan patojen veya yabancı maddelerin yok edilmesinde granülosit ve plazmatosit hücrelerinin iş birliği yaparak enkapsülasyonda görev aldığı bilinmektedir (Vigneron vd., 2019; Lavine ve Strand, 2002). Öncelikle vücuda giren büyük maddelerle ilk teması kuran granülositlerin tek bir katman oluşturduğu ve sonrasında plazmatositlerin de katılmasıyla çok katmanlı bir kapsül meydana geldiği, böylece hücre lizisi ile hastalık yapıcı etkenlere karşı savunma mekanizması gerçekleştiği bildirilmiştir (Pech ve Strand, 2000, 1996; Lavine ve Strand, 2002). Çalışmamızda artan dozlarda PS-MP'ye maruz kalan larvaların enkapsülasyon davranışlarında kontrole göre düşüş meydana gelirken dozlar arasında bir artış olduğu gözlemlendi. Doz grupları arasındaki bu artış humoral bağışıklığın önemli bir göstergesi olan melanizasyonla ilişkili olan ve doza bağlı önemli artış gösteren fenol oksidaz aktivitesiyle bağlantılı olabilir. Çünkü enkapsülasyonun sonucunda melanizasyon artışı da tetiklenerek patojen veya toksik maddelere karşı güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturulmaktadır (Altuntaş vd., 2012; Wang vd., 2024; Gwokyalya ve Altuntaş, 2019; Vigneron vd., 2019). Ancak kontrole göre larval hemositlerdeki enkapsülasyon davranışının azalması PS-MP'nin *T. molitor* larvalarında enkapsülasyon temelli hücrel bağışıklığı indüklediği anlamına gelmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde metalik ve polimerik NP'lerin böcek fizyolojisindeki etkileri ve toksisitesi ile ilgili yapılan bir başka çalışmada da PS-NP'lerinin hemositlerin kapsüllenme davranışında azalmaya neden olduğu ve enkapsülasyon temelli bağışıklığın baskılandığı belirtilmiştir (Demirtürk vd., 2024). Yapılan başka bir çalışmada açlık ve yetersiz besin kalitesi gibi olumsuz koşullarda FO aktivitesi ve enkapsülasyon ilişkisinin ayrıldığı öne sürülmüştür (Ardia vd., 2012). Hemolenfteki FO aktivitesinin artırılarak enkapsülasyondaki açığın

kapatılmaya çalışıldığı ancak substrat yetersizliği nedeniyle başarısız olduğu da belirtilmiştir (Yang vd., 2007). Bu nedenle, enkapsülasyondaki azalmanın aksine, PS-MP'ye kronik maruziyetin *T. molitor* larval hemolenfindeki FO aktivitesinde dolayısıyla melanizasyonda artış görülmesi, humoral bağışıklığı etkilediğine işaret ederken, bu durum PS-MP'nin larval besin kalitesini düşürmesinden kaynaklanabilir. Larvaların büyüme ve beslenme parametrelerindeki azalmaya yönelik elde ettiğimiz bulgular da düşüncemizi desteklemektedir.

Humoral ve hemosit- aracılı immünitinin ortak bir paydaşı olan melanizasyon tepkisinde rol oynayan FO enzimi, önositoidler tarafından sentezlendikten sonra hemolenfte inaktif zimojen olarak bulunur. Bağışıklığı uyaran bir durumla karşılaşıldığında aktive olduğu (Tabunoki vd., 2019) ve 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) ile birlikte dopamin türevi bileşikler okside ederek melanin oluşturulmasını sağladığı bilinmektedir (Nappi ve Ottaviani, 2000; Park vd., 2010). Hastalık yapıcı etkenlere (patojen veya yabancı madde) karşı gerçekleştirilen ve bu etkenlerin yok edilmesinde etkili olan melaninin ise böcek savunmasının önemli bir unsurudur (Barnes, 2000; Hillyer, 2016). *Chironomus riparius* (palyaço sineği) larvaları ile yapılan bir çalışmada elde ettiğimiz bulgulara benzer olarak, PE-MP'nin yüksek konsantrasyonlarında FO aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Bu durum araştırmacılar tarafından FO aktivitesindeki değişikliklerin böcek immünitesindeki MP toksisitesinin bir göstergesi olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Silva vd., 2021a). Bu nedenle *T. molitor* larval hemolenfinde FO aktivitesinin artış göstermesi, MP'lerin böcek bağışıklığında melanizasyonla ilişkili immün yanıtı neden olduğuna da işaret etmektedir. Aynı zamanda PS-MP'nin yüksek dozlarında artan önositoid oranı da FO aktivitesinde artışa neden olduğunu göstermektedir (Lavine ve Strand, 2002; Vigneron vd., 2019).

Fizyolojik strese maruz kalan organizmalarda protein katabolizması tetiklenerek enerji ihtiyacının karşılanması sağlanabileceği gibi, doku ve hücrelerdeki hasarın onarılması için de protein kaynakları kullanılabilir (Uçkan vd., 2021). Bu nedenle MP'ler gibi çevresel kirleticilere maruz kalan organizmalarda immünotoksik, sitotoksik veya genotoksik etkinin üstesinden gelebilmek için protein metabolizmasında değişimlerin olması kaçınılmazdır. Yapılan bir çalışmada naylon filament (0,18 mm) ile muamele edilen *T. molitor* larvalarının hemositlerindeki enkapsülasyon davranışındaki artışın yüksek metabolizmayla sonuçlandığı belirlenmiştir (Karms vd., 2013). Benzer bir sonuç farklı bir çalışmada da tespit edilerek, enkapsülasyon ve FO aktivitesinde meydana

gelen artış ile metabolizma arasında pozitif bir oran olduğu sonucuna varılmıştır (Ardia vd., 2012). Böceklerde immünolojik yanıt başlatıldıktan sonra vücuda giren yabancı etkenlerin veya patojenlerin tanınması için hemosit yüzeyinde patojenle ilgili molekülleri (PAMP) tanıyan bir çeşit kalıp tanıma reseptörleri (PRR) bulunduğu bildirilmiştir (Tsakas ve Marmaras, 2010). Lateks boncuk (1 µm) gibi yabancı maddelere ve patojenlere karşı *T. molitor*'un farklı gelişim evrelerindeki (larva, pupa, ergin) hemosit morfolojisindeki değişikliklerin incelendiği bir çalışmada ise lateks boncukların PAMP'lardan yoksun olması nedeniyle hemolenfteki proteinlerin bu maddelere yapışarak tanınmasını ve fagosite edilmesini sağladıkları öne sürülmüştür (Urbanski vd., 2018). Bu durum artan fagositoz aktivitesi ile protein miktarı arasında negatif bir korelasyon olabileceğini göstermektedir. Böylece böceklerde güçlü bir bağışıklık tepkisinin ortaya çıkması artan metabolizmaya ve dolayısıyla yüksek enerji ihtiyacı ile ilişkilidir. Yüksek dozlarda 1 µm boyutundaki PS-MP'ye besinle maruz kalan un kurdu larvalarının hemolenfindeki toplam protein miktarının azalmış olması da hem immünolojik verilerimizle hem de yukarıda bahsedilen fizyolojik nedenlerle uyumludur. Böylece protein miktarına yönelik bulgularımız, PS-MP'nin artan dozlarının kronik maruziyetinin larval hemolenfteki fagositoz gibi hücresel ve humoral mekanizmaları tetiklerken, sitotoksositeye neden olduğuna ve artan enerji ihtiyacına işaret etmektedir. Aynı zamanda fagositozun belirteci olan hücre yayılmasındaki doza bağlı artış da bu düşüncemizi destekler niteliktedir. Dolayısıyla bu durum MP toksisitesinin hem iyileşme sürecinde hem de savunma sırasında yüksek enerji kayıpları oluşturduğunu ve böylece larval hemolenfteki toplam protein miktarında azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda PS-MP'nin *T. molitor* larval hemositleri üzerindeki genotoksik etkilerinin belirlenmesinde DNA hasar tespiti için sıklıkla tercih edilen Comet yöntemi kullanıldı. Comet analizine göre, DNA hasarı, DNA iplikçiklerinin kırılmasıyla oluşan kuyruklu yıldız (comet) görünümü ile karakterize edilmektedir (Azqueta ve Collins, 2013). PS-MP veya NP'leri ile yapılan bazı çalışmalarda test edilen hücrelerin comet parametrelerinde artış olduğu bildirilmiştir (Avio vd., 2015; Brandts vd., 2018; Katsumiti vd., 2021; Nugnes vd., 2022; Alaraby vd., 2022; Turna vd., 2022; Moller ve Roursgaard, 2023; Martin-Folgar vd., 2024). Sucul canlılar (*Daphnia magna* ve *Neocaridini davidi*) ile gerçekleştirilen bir çalışmada 1 µm çapındaki PS-MP'nin DNA hasarının göstergeleri olan kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu parametrelerinde artış meydana geldiği belirlenmiştir (Berber, 2018). Bu çalışmada da DNA hasarını belirlemek

için kuyruk yoğunluğu (% DNA, tail intensity), kuyruk uzunluğu (tail length, μm), kuyruk momenti (tail moment, arbitrary unit) ve kuyruk göçü (tail migration, μm) değerleri analiz ile belirlendi. Daha önceki çalışmalara benzer olarak, sonuçlarımızda da besinle verilen 1 μm boyutundaki PS-MP'nin test edilen dozlarına kronik maruz kalan *T. molitor* larval hemositlerine ait tüm Comet parametrelerinde artış görülürken, DNA hasarının doz artışına bağlı olduğu da belirlendi. Turna vd., (2022)'nin yaptıkları çalışmada sonuçlarımıza benzer olarak test edilen tüm boyutlardaki PS-MP'lerin (4, 10 ve 20 μm) model organizma *D. melanogaster*'in larval hemositleri üzerinde DNA hasarına neden olduğu, cometlerdeki kuyruk yoğunluğunun hem yüksek dozlara hem de daha küçük parçacıklara (4 μm) maruz kalan larvalarda daha fazla olduğu belirlenmiştir (Turna vd., 2022). Ayrıca, MP'lerin ROS üretimini tetikleyerek DNA hasarına neden olabileceği ve genotoksik etkiler meydana getirebileceği de öne sürülmüştür (Avio vd., 2015; Schirinzi vd., 2017; Nugnes vd., 2022; Moller ve Roursgaard, 2023; Nugnes vd., 20). Elde ettiğimiz bulgularla birlikte tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde daha küçük parçacıklı PS-MP kronik maruziyetinin daha fazla DNA hasarına neden olması böcekler üzerindeki genotoksisiteyi de arttırdığını göstermektedir. Aynı zamanda, mikroplastiklerin boyutu arttıkça hücre zarını geçemese bile bağışıklıkla ilgili mekanizmaları tetikleyerek dolaylı yollardan genotoksik etkilere neden olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle PS-MP maruziyetinin oksidatif strese yer alan enzimatik aktiviteler üzerindeki etkilerinin de gelecekte araştırılması gerekmektedir. Sonuç olarak bu çalışma düşük boyutlu PS-MP'lerinin karasal böcek türü *T. molitor* larval immünitesinde genotoksik hasara neden olabileceğini gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca PS-MP doz uygulamasından sonra artan apoptoz, nekroz ve hücre çekirdeği hasar görmüş anormal hücre oranları da artan DNA hasarıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Çünkü hücrenin ölümüyle sonuçlanan bu olaylar sırasında gerçekleşen mekanizmalar dolaylı yoldan DNA hasarına neden olabilir.

Tez kapsamında elde edilen verilerimiz, doza bağlı 1 μm boyutlu PS-MP'nin *T. molitor* larval immünitesinde değişikliğe neden olduğunu ve uzun süreli maruziyetinde melanizasyon ve fagositoz temelli hem hemosit aracılı hem de humoral bağışıklığı etkilediğini göstermektedir. DNA hasarını gösteren COMET analizi bulguları ve larval hemolenfte tespit edilen anormal hücre oluşumları düşük boyutlu mikroplastik partiküllerin dokulardan geçerek açık dolaşıma katıldığına ve genotoksik hasara neden olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte un kurdunun gelişim biyolojisinde meydana

gelen değişiklikler, PS-MP'nin immünolojik gibi önemli fizyolojik etkileri nedeniyle larval metabolizmayı da değiştirdiğini göstermektedir. Sonuç olarak, un kurdu larvaları ile gerçekleştiren bu çalışmada elde edilen sonuçlar düşük boyutlu PS-MP'lerinin kronik maruziyetinin, doza bağlı olarak ekofizyolojik ve ekotoksikolojik etkileri olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, model böcekler içinde değerlendirilen *T. molitor* larvası üzerinde belirlenen bu etkilere yönelik bulgular, düşük boyutlu MP'lerin karasal böceklerle ilişkili çevresel ve ekolojik risk değerlendirmesi hakkındaki araştırmalara yeni bilgiler kazandırmaktadır.

Bulgularımız kapsamında böcek bağışıklığında MP toksisitesine dair önemli bilgiler sunulmakla birlikte, mikroplastiklerin böcek ekosistemlerindeki olası uzun vadeli etkilerinin incelenmesi için histokimyasal ve metabolizmal araştırmaların da yapılmasını öneriyoruz. Bununla birlikte farklı boyut ve dozlardaki MP maruziyetinin un kurdu gibi sosyo-ekonomik değere sahip karasal böceklerin besinsel değer üzerindeki ekofizyolojik ve ekotoksikolojik etkilerinin araştırılmasına yönelik bilimsel çalışmaların arttırılması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- Alaraby, M., Abass, D., Villacorta, A., Hernández, A., and Marcos, R. (2022). Antagonistic in vivo interaction of polystyrene nanoplastics and silver compounds. A study using *Drosophila*. *Science of the Total Environment*, 842, 156923.
- Ali, S. S., Elsamahy, T., Al-Tohamy, R., Zhu, D., Mahmoud, Y. A. G., Koutra, E., Metwally M. A., Kornaros M., Sun, J. (2021). Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects. *Science of the Total Environment*, 780, 146590.
- Altuntaş, H., Gwokyalaya, R., 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., Ergin, E. (2012). Effects of gibberellic acid on hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, 41(3), 688-696.
- Altuntaş H., Duman E., Kılıç G. (2020). Juglone induced oxidative and genotoxic stress in the model insect *Galleria mellonella* L. (Pyralidae: Lepidoptera). *International Journal of Tropical Insect Science*, 40, 611-619.
- Al-Jaibachi, R., Cuthbert, R. N., and Callaghan, A. (2018). Up and away: ontogenic transference as a pathway for aerial dispersal of microplastics. *Biology letters*, 14(9), 20180479.
- Amato-Lourenço, L. F., Carvalho-Oliveira, R., Júnior, G. R., dos Santos Galvão, L., Ando, R. A., and Mauad, T. (2021). Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of hazardous materials*, 416, 126124.
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., Pillai, S. (2021). Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. *Science of the Total Environment*, 759, 143536.
- Andaç, A. E., Tuncel, N. Y. (2023). Sürdürülebilir ve Yeni Bir Gıda Alternatifi Olarak Yenilebilir Böcekler. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 9(1), 251-267.
- Ardia, D. R., Gantz, J. E., Schneider B. C, Strebel, S. (2012). Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Functional ecology*, 26(3), 732-739.
- Artham, T., and Doble, M. (2008). Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromolecular bioscience*, 8(1), 14-24.
- Asaithamby, A., and Chen, D. J. (2011). Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 87-99.

- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., and Regoli, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental pollution*, 198, 211-222.
- Azqueta, A., and Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of toxicology*, 87, 949-968.
- Babonaitė, M., Čepulis, M., Kazlauskaitė, J., and Lazutka, J. R. (2023). Evaluation of In Vitro Genotoxicity of Polystyrene Nanoparticles in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Toxics*, 11(7), 627.
- Bahl, S., Dolma, J., Singh, J. J., and Sehgal, S. (2021). Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*, 39, 31-34.
- Belal, R., Gad, A. (2023). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress, genotoxicity, and apoptosis in the hemocytes of *Bombyx mori* larvae. *Scientific Reports*, 13(1), 3520.
- Berber, A. A. (2019). Genotoxic evaluation of polystyrene microplastic. *Sakarya University Journal of Science*, 23(3), 358-367.
- Besseling, E., Wang, B., Lurling, M., and Koelmans, A. A. (2014). Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental science and technology*, 48(20), 12336-12343.
- Bordiean, A., Krzyżaniak, M., Stolarski, M. J. (2022). Bioconversion Potential of Agro-Industrial Byproducts by *Tenebrio molitor*-Long-Term Results. *Insects*, 13(9), 810.
- Bulak, P., Proc, K., Pytlak, A., Puszka, A., Gawdzik, B., Bieganski, A. (2021). Biodegradation of different types of plastics by *Tenebrio molitor* insect. *Polymers*, 13(20), 3508.
- Bhagat, J., Zang, L., Nishimura, N., and Shimada, Y. (2020). Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. *Science of The Total Environment*, 728, 138707.
- 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.
- Brandon, A. M., Gao, S. H., Tian, R., Ning, D., Yang, S. S., Zhou, J., Wu, W. M., Criddle, C. S. and Criddle, C. S. (2018). Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome. *Environmental science and technology*, 52(11), 6526-6533.
- Brandts, I., Teles, M., Gonçalves, A. P., Barreto, A., Franco-Martinez, L., Tvarijonavičiute, A., Martins, M. A., Soares, A. M. V. M. and Oliveira, M. (2018). Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. *Science of the total environment*, 643, 775-784.

- Brai, A., Poggialini, F., Vagaggini, C., Pasqualini, C., Simoni, S., Francardi, V., Dreassi, E. (2023). *Tenebrio molitor* as a Simple and Cheap Preclinical Pharmacokinetic and Toxicity Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2296.
- Cinege, G., Lerner, Z., Magyar, L. B., Soós, B., Tóth, R., Kristó, I., Vilmos, P., Juhász, G., Kovács, A. L., Hegedűs, Z., Sensen, C. W., Kurucz, É. and Andó, I. (2020). Cellular immune response involving multinucleated giant hemocytes with two-step genome amplification in the drosophilid *Zaprionus indianus*. *Journal of Innate Immunity*, 12(3), 257-272.
- Cook, S.M., McArthur J.D. (2013). Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*, 4(5), 350-353.
- Chang, X., Xue, Y., Li, J., Zou, L., Tang, M. (2020). Potential health impact of environmental micro-and nanoplastics pollution. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 4-15.
- Cho, Y., and Cho, S. (2019). Hemocyte-hemocyte adhesion by granulocytes is associated with cellular immunity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Scientific Reports*, 9(1), 18066.
- Czarniewska, E., Sielicki, K., Maślana, K., Mijowska, E. (2023). In vivo study on borophene nanoflakes interaction with *Tenebrio molitor* beetle: viability of hemocytes and short-term immunity effect. *Scientific Reports*, 13(1), 11823.
- de Souza, P. C., Morey, A. T., Castanheira, G. M., Bocate, K. P., Panagio, L. A., Ito, F. A., ... and Almeida, R. S. (2015). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *Journal of microbiological methods*, 118, 182-186.
- Demirtürk, Z., Uçkan, F., and Mert, S. (2024). Interactions of alumina and polystyrene nanoparticles with the innate immune system of *Galleria mellonella*. *Drug and Chemical Toxicology*, 47(5), 483-495.
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., and Ren, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific reports*, 7(1), 46687.
- Di Liberto, E. A., Battaglia, G., Pellerito, R., Curcuruto, G., and Dintcheva, N. T. (2024). Biodegradation of Polystyrene by Plastic-Eating Tenebrionidae Larvae. *Polymers*, 16(10), 1404.
- 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.
- Duman, E. E., and Altuntaş, H. (2018). Genotoxicity of azadirachtin on *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Biological Diversity and Conservation*, 11(3), 24-30.

- Dreyer, M., Hörtenhuber, S., Zollitsch, W., Jäger, H., Schaden, L. M., Gronauer, A., Kral, I. (2021). Environmental life cycle assessment of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) production for human consumption in Austria—a comparison of mealworm and broiler as protein source. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 26, 2232-2247.
- Dris, R., Gasperi, J., Mirande, C., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., and Tassin, B. (2017). A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments. *Environmental pollution*, 221, 453-458.
- EFSA Scientific Committee. (2015). Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal*, 13(10), 425.
- El Kholy, S., and Al Naggar, Y. (2023). Exposure to polystyrene microplastic beads causes sex-specific toxic effects in the model insect *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, 13(1), 204.
- Elmekawy, A., Elshehaby, M., Saber, S., Ayaad, T. (2023). Evaluation of *Galleria mellonella* immune response as a key step toward plastic degradation. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 84(1), 27.
- Errico, S., Spagnoletta, A., Verardi, A., Moliterni, S., Dimatteo, S., Sangiorgio, P. (2022). *Tenebrio molitor* as a source of interesting natural compounds, their recovery processes, biological effects, and safety aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 148-197.
- Gad, A. A. (2020). Toxicity effect of Silver Nanoparticles to the Haemocytes and Antioxidant activity of Silkworm *Bombyx mori*. *Physiological Entomology*, 45(4), 154-160.
- Gardiner, E. M. M., and Strand, M. R. (2000). Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 43(4), 147-164.
- Gasperi, J., Dris, R., Mirande-Bret, C., Mandin, C., Langlois, V., and Tassin, B. (2015). First overview of microplastics in indoor and outdoor air. In *15th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment*.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7), e1700782.
- Gökkaya, T. N. E. (2022). Polistiren Nanopartiküllerinin Konak *Galleria mellonella* ve Endoparazitoid *Pimpla turionellae*'nın Yaşam Döngüsü ile Konak Hemositlerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Kocaeli: *Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Gündoğdu, S., Eroldoğan, O. T., Evliyaoğlu, E., Turchini, G. M., Wu, X. G. (2021). Fish out, plastic in: Global pattern of plastics in commercial fishmeal. *Aquaculture*, 534, 736316.

- Gwokyalya, R., 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.
- Gwokyalya, R., Herren, J. K., Weldon, C. W., Khamis, F. M., Ndlela, S., and Mohamed, S. A. (2022). Differential immune responses in new and old fruit fly-parasitoid associations: Implications for their management. *Frontiers in physiology*, 13, 945370.
- Halloran, A., Vantome, P. (2020). Insects for food and feed: the contribution of insects to food security, livelihoods and the environment. *Food and Agriculture Organization (FAO)*.
- Hao, Y., Yu, S., Luo, F., and Jin, L. H. (2018). Jumu is required for circulating hemocyte differentiation and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Communication and Signaling*, 16, 1-20.
- Hartmann, N. B., Huffer, T., Thompson, R. C., Hasselov, M., Verschoor, A., Daugaard, A. E., Rist, S., Karlsson, T., Brennholt, N., Cole, M., Herrling, M. P., Hess, M. C., Ivleva, N. P., Lusher, A. L., Wagner, M. (2019). Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris.
- Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N. ve Saotome, K. (1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*, 399,125-33.
- He, D., Luo, Y. (2020). Microplastics in terrestrial environments. *Emerging Contaminants and Major Challenges; Springer: Cham, Switzerland*, 87-130.
- Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W. and Salamone, M.F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency, gene-tox program. *Mutation Research*, 123, 61-118.
- Hillyer, J.F., Insect immunology and hematopoiesis. (2016). *Developmental and Comparative Immunology*, 58, 102-118.
- Ho, B. T., Roberts, T. K., Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Critical reviews in biotechnology*, 38(2), 308-320.
- Hoffmann, J. A. Innate immunity of insects. (1995). *Current opinion in immunology*, 7(1), 4-10.
- Hong J., Han T., Kim Y.Y. (2020). Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an Alternative Protein Source for Monogastric Animal: A Review. *Animals*, 10(11):2068.

- Jiang, S., Su, T., Zhao, J., Wang, Z. (2021). Biodegradation of polystyrene by *Tenebrio molitor*, *Galleria mellonella*, and *Zophobas atratus* larvae and comparison of their degradation effects. *Polymers*, 13(20), 3539.
- Jiang, Y., Yang, F., Kazmi, S. S. U. H., Zhao, Y., Chen, M., Wang, J. (2022). A review of microplastic pollution in seawater, sediments and organisms of the Chinese coastal and marginal seas. *Chemosphere*, 286, 131677.
- Jones, J. C., and Tauber, O. E. (1954). Abnormal hemocytes in mealworms (*Tenebrio molitor* L.). *Annals of the Entomological Society of America*, 47(3), 428-444.
- Kasmuri, N., Tarmizi, N. A. A., Mojiri, A. (2022). Occurrence, impact, toxicity, and degradation methods of microplastics in environment-a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(21), 30820-30836.
- Katsumiti, A., Losada-Carrillo, M. P., Barros, M., and Cajaraville, M. P. (2021). Polystyrene nanoplastics and microplastics can act as Trojan horse carriers of benzo (a) pyrene to mussel hemocytes in vitro. *Scientific Reports*, 11(1), 22396.
- Kaya, A. T., Yurtsever, M., Bayraktar, S. Ç. (2018). Ubiquitous exposure to microfiber pollution in the air. *The European Physical Journal Plus*, 133(11), 488.
- Kavanagh K., Reeves E.P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.*, 28(1), 101-112.
- Kavanagh, K., and Reeves, E. P. (2007). Insect and mammalian innate immune responses are much alike. *Microbe*, 2(12), 596-599.
- Kershaw, P. J., Turra, A., Galgani, F. (2019). Guidelines for the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean. *GESAMP Reports and Studies*, (No. 99).
- Kojour, M. A. M., Han, Y. S., Jo, Y. H. (2020). An overview of insect innate immunity. *Entomological Research*, 50(6), 282-291.
- Krams, I., Daukste, J., Kivleniece, I., Kaasik, A., Krama, T., Freeberg, T. M., and Rantala, M. J. (2013). Trade-off between cellular immunity and life span in mealworm beetles *Tenebrio molitor*. *Current Zoology*, 59(3), 340-346.
- Krueger, M. C., Harms, H., Schlosser, D. (2015). Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 8857-8874.
- Lavine, M. D., and Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10), 1295-1309.
- LeMoine, C. M., Kelleher, B. M., Lagarde, R., Northam, C., Elebute, O. O., and Cassone, B. J. (2018). Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental pollution*, 243, 591-600.

- Lett, Z., Hall, A., Skidmore, S., and Alves, N. J. (2021). Environmental microplastic and nanoplastic: Exposure routes and effects on coagulation and the cardiovascular system. *Environmental Pollution*, 291, 118190.
- Li, Y., Liu, Q., Junaid, M., Chen, G., and Wang, J. (2023). Distribution, sources, transportation and biodegradation of microplastics in the soil environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 164, 117106.
- Liu, L. N., Wang, C. Y. (2014). Complete mitochondrial genome of yellow meal worm (*Tenebrio molitor*). *Zoological Research*, 35(6), 537.
- 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), 15775.
- Ling, E., and Yu, X. Q. (2006). Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(3), 301-309.
- Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., Ren, H. (2016). Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental science and technology*, 50(7), 4054-4060.
- Machona, O., Chidzwondo, F., and Mangoyi, R. (2022). *Tenebrio molitor*: possible source of polystyrene-degrading bacteria. *BMC biotechnology*, 22(1), 2.
- Mak, C. W., Yeung, K. C. F., and Chan, K. M. (2019). Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish. *Ecotoxicology and environmental safety*, 182, 109442.
- Martin-Folgar, R., Sabroso, C., Cañas-Portilla, A. I., Torres-Ruiz, M., González-Caballero, M. C., Dorado, H., Velasco, I., Morales, M. (2024.) DNA damage and molecular level effects induced by polystyrene (PS) nanoplastics (NPs) after *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Chemosphere*, 346, 140552.
- Matyja, K., Rybak, J., Hanus-Lorenz, B., Wróbel, M., and Rutkowski, R. (2020). Effects of polystyrene diet on *Tenebrio molitor* larval growth, development and survival: Dynamic Energy Budget (DEB) model analysis. *Environmental Pollution*, 264, 114740.
- Moller, P., and Roursgaard, M. (2023). Exposure to nanoplastic particles and DNA damage in mammalian cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 108468.
- Moruzzo, R., Riccioli, F., Espinosa Diaz, S., Secci, C., Poli, G., Mancini, S. (2021). Mealworm (*Tenebrio molitor*): potential and challenges to promote circular economy. *Animals*, 11(9), 2568.

- Muhammad, A., Zhou, X., He, J., Zhang, N., Shen, X., Sun, C., Yan, B., Shao, Y. (2021). Toxic effects of acute exposure to polystyrene microplastics and nanoplastics on the model insect, silkworm *Bombyx mori*. *Environmental pollution*, 285, 119255.
- McKeen W. L. (2008). Styrenic Plastics: Effect of Temperature and other Factors on Plastics and Elastomers, W. Andrew (Ed.). *Plastics Design Library*, 41-45.
- Nappi, A. J., and Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, 22(5), 469-480.
- Nivetha, R., Marieshwari, B. N., Dev, A. P. M., Meenakumari, M., Muralisankar, T., and Janarthanan, S. (2023). Evaluation of haemolymph phenoloxidase activity from the grub of *Zophobas morio* as a predictor of immune response. *Journal of Comparative Physiology B*, 193(5), 495-507.
- Nowicki, P., Kuczer, M., Schroeder, G., Czarniewska, E. (2021). Disruption of insect immunity using analogs of the pleiotropic insect peptide hormone Neb-colloostatin: a nanotech approach for pest control II. *Scientific Reports*, 11(1), 9459.
- Nugnes, R., Lavorgna, M., Orlo, E., Russo, C., and Isidori, M. (2022). Toxic impact of polystyrene microplastic particles in freshwater organisms. *Chemosphere*, 299, 134373.
- Oonincx, D. G., and De Boer, I. J. (2012). Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans—a life cycle assessment. *PloS ONE*, 7(12), e51145.
- Oonincx, D. G. A. B., van Broekhoven, S., van Huis, A., and van Loon, J. J. A. (2015). Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS ONE*, 10(12), e0144601.
- Olive, P. L., and Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, 1(1), 23-29.
- Orts, J. M., Parrado, J., Pascual, J. A., Orts, A., Cuartero, J., Tejada, M., and Ros, M. (2022). Polyurethane foam residue biodegradation through the *Tenebrio molitor* digestive tract: microbial communities and enzymatic activity. *Polymers* 2023, 15.
- Otake, Y., Kobayashi, T., Asabe, H., Murakami, N., and Ono, K. (1995). Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride, and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years. *Journal of Applied Polymer Science*, 56(13), 1789-1796.
- Özgen, S. (2022). Polistiren temelli mikroplastiklerin model organizma *Galleria mellonella* hemosit aracılı bağışıklık ve antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri. Balıkesir: *Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*.

- Özsoy, A. N., Gündoğdu, E. (2017). *Tenebrio molitor* L. (Un Kurdu)'de Büyüme ve Gelişim Karakterlerine Ait Genetik Parametre Tahminleri. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12(2), 90-99.
- Pauly, J. L., Stegmeier, S. J., Allaart, H. A., Cheney, R. T., Zhang, P. J., Mayer, A. G., Streck, R. J. (1998). Inhaled cellulosic and plastic fibers found in human lung tissue, Cancer epidemiology, biomarkers and prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 7(5), 419-428.
- Park, J. W., Kim, C. H., Rui, J., Ryu, K. H., Chai, J. H., Hwang, H. O., Kurokawa, K., Ha, N. C., Söderhall, I., Söderhall, K. and Lee, B. L. (2010). Beetle immunity. *Invertebrate Immunity*, 163-180.
- 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., and Strand, M. R. (2000). Plasmacytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *Journal of Insect Physiology*, 46(12), 1565-1573.
- Peng, B. Y., Su, Y., Chen, Z., Chen, J., Zhou, X., Benbow, M. E., Criddle, C. S., Wu, W. M. and Zhang, Y. (2019). Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and yellow (*Tenebrio molitor*) mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental science and technology*, 53(9), 5256-5265.
- Peng, B. Y., Sun, Y., Li, P., Yu, S., Xu, Y., Chen, J., Zhou, X., Zhang, Y. (2023). Biodegradation of polyvinyl chloride, polystyrene, and polylactic acid microplastics in *Tenebrio molitor* larvae: Physiological responses. *Journal of Environmental Management*, 345, 118818.
- Pilevar, Z., Bahrami, A., Beikzadeh, S., Hosseini, H., and Jafari, S. M. (2019). Migration of styrene monomer from polystyrene packaging materials into foods: Characterization and safety evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 91, 248-261.
- Pinchi, J. E., Galvez, J. O., Castaneda-Olivera, C. A., and Alfaro, E. G. B. (2022). Environmental biotechnology: Biodegradation of microplastics with larvae of *Tenebrio molitor* and *Galleria mellonella*. *Chemical Engineering Transactions*, 93, 187-192.
- Punzo, F., and Mutchmor, J. A. (1980). Effects of temperature, relative humidity and period of exposure on the survival capacity of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 260-270.
- PlasticsEurope. Plastics—the facts. (2023).
- Rasmussen, N. H. (2014). The cellular and humoral immune response of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) towards two types of parasites. *Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, (Master Thesis)*.

- Revel, M., Châtel, A., and Mouneyrac, C. (2018). Micro (nano) plastics: a threat to human health? *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 1, 17-23.
- Ribeiro, F., Garcia, A. R., Pereira, B. P., Fonseca, M., Mestre, N. C., Fonseca, T. G., Ilharco L. M., Bebianno, M. J. (2017). Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 379-391.
- Rodríguez-Seijo, A., da Costa, J. P., Rocha-Santos, T., Duarte, A. C., and Pereira, R. (2018). Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 33599-33610.
- Putra, I. L. I., Nurcahyasari, A. 2021. Degradation of Some Polystyrene Using Beetle Larvae (*Tenebrio Molitor* L.). *BIOLINK (Jurnal Biologi Lingkungan Industri Kesehatan)*, 8(1), 92-102.
- Rhodes, C. J. (2018). Plastic pollution and potential solutions. *Science progress*, 101(3), 207-260.
- Sanchez-Hernandez, J. C. (2021). A toxicological perspective of plastic biodegradation by insect larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 248, 109117.
- Selonen, S., Dolar, A., Kokalj, A. J., Skalar, T., Dolcet, L. P., Hurley, R., and van Gestel, C. A. (2020). Exploring the impacts of plastics in soil–The effects of polyester textile fibers on soil invertebrates. *Science of the Total Environment*, 700, 134451.
- Siddiqui, S. A., Singh, S., Bahmid, N. A., Shyu, D. J., Domínguez, R., Lorenzo, J. M., ... and Câmara, J. S. (2023). Polystyrene microplastic particles in the food chain: Characteristics and toxicity-A review. *Science of The Total Environment*, 892, 164531.
- Silva, C. J., Beleza, S., Campos, D., Soares, A. M., Silva, A. L. P., Pestana, J. L., Gravato, C. (2021). Immune response triggered by the ingestion of polyethylene microplastics in the dipteran larvae *Chironomus riparius*. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125401.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Schirinzi, G. F., Pérez-Pomeda, I., Sanchís, J., Rossini, C., Farré, M., Barceló, D. (2017). Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research*, 159, 579-587.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 26(3), 246-265.
- Shen, J., Liang, B., and Jin, H. (2023). The impact of microplastics on insect physiology and the indication of hormesis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 165, 117130.

- Shi, X., Huang, R., Wang, X., Tang, C., Hu, C., and Wang, F. (2021). Cytotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics with different size and surface modification in A549 human lung cells. *Available at SSRN* 3935593.
- Sridharan, S., Kumar, M., Singh, L., Bolan, N. S., and Saha, M. (2021). Microplastics as an emerging source of particulate air pollution: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 418, 126245.
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect science*, 15(1), 1-14.
- Strand, M. R., and Clark, K. D. (1999). Plasmacyte spreading peptide induces spreading of plasmacytes but represses spreading of granulocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 42(3), 213-223.
- Tabunoki, H., Dittmer, N. T., Gorman, M. J., and Kanost, M. R. (2019). Development of a new method for collecting hemolymph and measuring phenoloxidase activity in *Tribolium castaneum*. *BMC research notes*, 12, 1-7.
- Tanaka, K., and Takada, H. (2016). Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Scientific reports*, 6(1), 34351.
- Teng, Z. W., Xu, G., Gan, S. Y., Chen, X., Fang, Q., Ye, G. Y. (2016). Effects of the endoparasitoid *Cotesia chilonis* (Hymenoptera: Braconidae) parasitism, venom, and calyx fluid on cellular and humoral immunity of its host *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae. *Journal of Insect Physiology*, 85, 46-56.
- Turna Demir, F., Akkoyunlu, G., and Demir, E. (2022). Interactions of ingested polystyrene microplastics with heavy metals (cadmium or silver) as environmental pollutants: a comprehensive in vivo study using *Drosophila melanogaster*. *Biology*, 11(10), 1470.
- Tsakas, S., and Marmaras, V. J. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7(2), 228-238.
- Uçkan, F., Öztürk, Z., Altuntaş, H., and Ergin, E. (2011). Effects of gibberellic acid (GA3) on biological parameters and hemolymph metabolites of the pupal endoparasitoid *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of the Entomological Research Society*, 13(3), 1-14.
- Umamaheswari, S., Priyadarshinee, S., Bhattacharjee, M., Kadirvelu, K., and Ramesh, M. (2021). Exposure to polystyrene microplastics induced gene modulated biological responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 281, 128592.
- Urbański, A., Adamski, Z., and Rosiński, G. (2018). Developmental changes in haemocyte morphology in response to *Staphylococcus aureus* and latex beads in the beetle *Tenebrio molitor* L. *Micron*, 104, 8-20.

- Urbański, A., Konopińska, N., Lubawy, J., Walkowiak-Nowicka, K., Marciniak, P., and Rolff, J. (2021). A possible role of tachykinin-related peptide on an immune system activity of mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. *Developmental and Comparative Immunology*, 120, 104065.
- Urbański, A., Konopińska, N., Bylewska, N., Gmyrek, R., Spochacz-Santoro, M., Bufo, S. A., and Adamski, Z. (2023). *Solanum nigrum* Fruit Extract Modulates Immune System Activity of Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor* L. *Toxins*, 15(1), 68.
- Van Broekhoven, S., Oonincx, D. G., Van Huis, A., and Van Loon, J. J. (2015). Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species (Coleoptera: Tenebrionidae) on diets composed of organic by-products. *Journal of insect physiology*, 73, 1-10.
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. *Food and agriculture organization of the United Nations*, (No. 171).
- Veneman, W. J., Spaink, H. P., Brun, N. R., Bosker, T., and Vijver, M. G. (2017). Pathway analysis of systemic transcriptome responses to injected polystyrene particles in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 190, 112-120.
- Viana, T. A., Botina, L. L., Bernardes, R. C., Barbosa, W. F., Xavier, T. K. D., Lima, M. A. P., Araújo, R. S., Martins, G. F. (2023). Ingesting microplastics or nanometals during development harms the tropical pollinator *Partamona helleri* (Apinae: Meliponini). *Science of The Total Environment*, 164790.
- Vigneron, A., Jehan, C., Rigaud, T., Moret, Y. (2019). Immune defenses of a beneficial pest: the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Frontiers in physiology*, 10, 138.
- Volkman BJ, Anderson ME, Clark KD, Hayakawa Y, Strand MR, Markley JL. (1999). Structure of the insect cytokine Plasmacyte Spreading Peptide from *Pseudoplusia includens*. *J Biol Chem* 274:4493–4496.
- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., and Köhler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental science and technology*, 46(20), 11327-11335.
- Wang, S., Miao, S., Li, Y., Wang, J., Li, C., Lu, Y., and Li, B. (2024). Morphological and functional characterization of circulating hemocytes in *Tribolium castaneum* larvae. *Insect Science*.
- Wang Y., Li D.D., Jiang Y.Y., Mylonakis E. (2013). Utility of Insects for Studying Human Pathogens and Evaluating New Antimicrobial Agents. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 135, 1-25.
- Wan, Y., Wu, C., Xue, Q., Hui, X. (2019). Effects of plastic contamination on water evaporation and desiccation cracking in soil. *Science of the Total Environment*, 654, 576-582.

- 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.
- Waring, R. H., Harris, R. M., Mitchell, S. C. (2018). Plastic contamination of the food chain: A threat to human health. *Maturitas*, 115, 64–68.
- World Health Organization (WHO). (2019). Microplastics in Drinking-water (Geneva. License: CCBY-NC-SA 3.0 IGO).
- Wu, P., Huang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Zhang, Y., He, F., Chen, H., Quan, G., Yan, J., Li, T., Gao, B. (2019). Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics. *Ecotoxicology and environmental safety*, 184, 109612.
- Wu, Q., Tao, H., Wong, M. H. (2019). Feeding and metabolism effects of three common microplastics on *Tenebrio molitor* L. *Environmental geochemistry and health*, 41, 17-26.
- Xiang, Y., Jiang, L., Zhou, Y., Luo, Z., Zhi, D., Yang, J., Lam, S. S. (2022). Microplastics and environmental pollutants: key interaction and toxicology in aquatic and soil environments. *Journal of Hazardous Materials*, 422, 126843.
- Xie, Y., Li, Y., Feng, Y., Cheng, W., and Wang, Y. (2022). Solunabilir mikroplastikler havada baskındır: Boyut tespit sınırını araştırmak. *Çevre uluslararası*, 162, 107151.
- Yang, L., Gao, J., Liu, Y., Zhuang, G., Peng, X., Wu, W. M., Zhuang, X. (2021). Biodegradation of expanded polystyrene and low-density polyethylene foams in larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae): Broad versus limited extent depolymerization and microbe-dependence versus independence. *Chemosphere*, 262, 127818.
- Yang, S., Ruuhola, T., and Rantala, M. J. (2007, January). Impact of starvation on immune defense and other life-history traits of an outbreaking geometrid, *Epirrita autumnata*: a possible causal trigger for the crash phase of population cycle. In *Annales Zoologici Fennici* (pp. 89-96). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Yang, S. S., Wu, W. M., Brandon, A. M., Fan, H. Q., Receveur, J. P., Li, Y., ..., Criddle, C. S. (2018). Ubiquity of polystyrene digestion and biodegradation within yellow mealworms, larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Chemosphere*, 212, 262-271.
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W. M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R., Jiang, L. (2015). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests. *Environmental science and technology*, 49(20), 12080-12086.
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W. M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R., Jiang, L. (2015). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms:

part 2. Role of gut microorganisms. *Environmental science and technology*, 49(20), 12087-12093.

- Yu, X. Q., and Kanost, M. R. (2004). Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(9), 891-900.
- Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y., Yu, F. (2020). Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *Science of the Total Environment*, 715, 136968.
- Yurtsever, M. (2018). Küresel plastik kirliliği nano-mikroplastik tehlikesi ve sürdürülebilirlik. *Çevre Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1, 171-197.
- Zamzami, N., and Kroemer, G. (1999). Condensed matter in cell death. *Nature*, 401(6749), 127-128.
- Zang, H., Zhou, J., Marshall, M. R., Chadwick, D. R., Wen, Y., Jones, D. L. (2020). Microplastics in the agroecosystem: Are they an emerging threat to the plant-soil system? *Soil Biology and Biochemistry*, 148, 107926.
- Zielińska, E., Zieliński, D., Jakubczyk, A., Karaś, M., Pankiewicz, U., Flasz, B., Dziewiecka, M. and Lewicki, S. (2021). The impact of polystyrene consumption by edible insects *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* on their nutritional value, cytotoxicity, and oxidative stress parameters. *Food Chemistry*, 345, 128846.
- Zhang, X., Tang, H., Chen, G., Qiao, L., Li, J., Liu, B., ... and Liu, X. (2019). Growth performance and nutritional profile of mealworms reared on corn stover, soybean meal, and distillers' grains. *European Food Research and Technology*, 245, 2631-2640.
- Zheng, Y., Yanful, E. K., and Bassi, A. S. (2005). A review of plastic waste biodegradation. *Critical reviews in biotechnology*, 25(4), 243-250.
- Zhong, Z., Nong, W., Xie, Y., Hui, J. H. L., and Chu, L. M. (2022). Long-term effect of plastic feeding on growth and transcriptomic response of mealworms (*Tenebrio molitor* L.). *Chemosphere*, 287, 132063.

http-1: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Polistiren> (Erişim tarihi: 09.08.2024)

ÖZGEÇMİŞ

ORCID NO: 0000-0003-4861-6077

Ad Soyad : Nurşen ŞİMŞEKATAN

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2017, Lise, Namık Kemal Lisesi, Matematik-Fen Bölümü, Gazimağusa, K.K.T.C.
- 2022, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- 2025, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Yayınları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

- 2023, Sözlü Sunum, 6. Ulusal Zooloji Kongresi, Çevrimiçi Konferans