

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI GIDA KORUYUCU MADDELERİN MODEL HAYVAN *Galleria mellonella* L.  
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) LARVALARINDA HEMOSİT ARACILI İMMÜN SİSTEM  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Emine DUMAN ERBAŞ**

**OCAK 2021  
TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI GIDA KORUYUCU MADDELERİN MODEL HAYVAN *Galleria mellonella* L.  
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) LARVALARINDA HEMOSİT ARACILI İMMÜN SİSTEM  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Emine DUMAN ERBAŞ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**  
**"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"**  
**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 28 / 12 / 2020**

**Tezin Savunma Tarihi : 28 / 01 / 2021**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Bilal KUTRUP**

**İkinci Danışman : Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ**

**Trabzon 2021**

## ÖNSÖZ

“Bazı Gıda Koruyucu Maddelerin Model Hayvan *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarında Hemosit Aracılı İmmün Sistem Üzerine Etkileri” isimli bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır. Çalışma kapsamında, gıda koruyucu maddeler arasında yer alan Sodyum Benzoat, Sodyum Nitrat ve Sodyum Nitrit maddeleri model organizma olarak kullanılan *Galleria mellonella* larvalarına zorla besleme yöntemi ile uygulanmış, sonrasında larvalarda hemosit aracılı immün sistem etkilerinin araştırılması amacıyla toplam ve farklı hemosit sayıları, hemositlerin yapışma kabiliyeti, hemosit ölümü (apoptoz-nekroz), mitotik indeks, nodulasyon ve enkapsülasyon mekanizmaları incelenmiştir. Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: FYL-2020-8639).

Yüksek lisans çalışmalarımın akademik ve teknik bilgilerini, tecrübesini ve fizyoloji alanında teknik altyapının oluşturması konusunda yardımlarını esirgemeyen çok değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Bilal KUTRUP’a içtenlikle teşekkür ederim. Hayvan Fizyolojisi alanında şimdiye kadar öğretmiş oldukları ve yapmış olduğum yüksek lisans tez çalışmamın tüm süreçlerinde yanımda olan, akademik hayatımda model aldığım İkinci Danışmanım Eskişehir Teknik Üniversitesi öğretim üyesi sevgili Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ’a sonsuz teşekkür ederim. Aynı zamanda çok değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Ufuk BÜLBÜL ve Doç. Dr. Nevran Eylem GÜNDÜZ’e değerli görüşlerinden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca deneysel çalışmalarım sırasında deneyimlerini paylaşan ve yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Rehemah GWOKYALY’a sonsuz teşekkür ederim. Son olarak akademik hayatımı kolaylaştıran, sevgi ve saygısı ile maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli eşim Sabahattin ERBAŞ’a çok teşekkür ederim.

Emine DUMAN ERBAŞ

Trabzon 2021

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bazı Gıda Koruyucu Maddelerin Model Hayvan *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarında Hemosit Aracılı İmmün Sistem Üzerine Etkileri” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Bilal KUTRUP’un sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 28/01/2021

Emine DUMAN ERBAŞ

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Benzoik Asit.....	2
1.3. Nitrit ve Nitrat.....	3
1.4. Toksikite Analizlerinde Kullanılan Yeni Model Organizmalar.....	4
1.5. Böceklerde Bağışıklık Sistemi.....	7
1.6. Model Böcek <i>Galleria mellonella</i> L. (Lepidoptera: Pyralidae).....	11
1.6.1. Sistematikteki Yeri.....	12
1.7. Amaç ve Hipotez.....	13
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. <i>Galleria mellonella</i> Stok Kültürlerinin Kurulması.....	14
2.2. Sodyum Benzoat, Sodyum Nitrat ve Sodyum Nitritin Hazırlanması.....	15
2.3. Zorla Besleme (Force Feeding) Yöntemi.....	15
2.4. Sodyum Benzoat, Sodyum Nitrat ve Sodyum Nitritin <i>G. mellonella</i> Larvalarının Hemositleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	16
2.3.1. Toplam Hemosit Sayısı.....	17
2.3.2. Farklı Hemosit Sayıları ve Mitotik İndeks.....	18
2.3.3. Hemosit Yayılması.....	19

2.3.4. Nodülasyon.....	20
2.3.5. Enkapsülasyon ve Melanizasyon.....	20
2.3.6. Hücre Ölümü (Apoptoz ve Nekroz) .....	21
2.3.7. İstatistiksel Analizler .....	23
3. BULGULAR .....	24
3.1. Toplam Hemosit Sayısı .....	24
3.2. Farklı Hemosit Sayıları ve Mitotik İndeks .....	25
3.3. Hemosit Yayılması .....	27
3.4. Nodülasyon.....	29
3.5. Enkapsülasyon ve Melanizasyon.....	30
3.6. Hücre Ölümü (Apoptoz/Nekroz).....	33
4. TARTIŞMA.....	36
5. SONUÇLAR.....	43
6. ÖNERİLER .....	44
7. KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

## ÖZET

### **BAZI GIDA KORUYUCU MADDELERİN MODEL HAYVAN *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) LARVALARINDA HEMOSİT ARACILI İMMÜN SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ**

Emine DUMAN ERBAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Bilal KUTRUP  
2021, 59 Sayfa

Bu çalışmada gıda koruyucu maddeler arasında yer alan sodyum benzoat (SB, E211), sodyum nitrat (SNa, E251) ve sodyum nitrit'in (SNI, E250) model organizma *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları üzerindeki immünojenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında değerlendirilen tüm parametrelerin analizlenmesinde böceğe ait son evre larvalar kullanıldı. Bu amaçla, SB, SNa ve SNI'ye ait ortalama letal dozlar larvalara zorla besleme (force feeding) yöntemi ile uygulandı. SB, SNa ve SNI ile zorla beslenen larvalarda toplam hemosit sayımları, prohemosit ve granülasit oranları azalırken, plazmatosit, siferülosit, oenosit oranları ile mitotik indekslerde artış olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, gıda koruyucu maddelerin kapsülleme ve melanizasyon hedefi olan Sephadex DEAE boncuklarında kapsül oluşumunu, melanizasyon tepkimelerini ve laminarin enjeksiyonu ile indüklenen nodül oluşumunu azalttığı tespit edildi. Ayrıca, gıda koruyucu maddelere bağlı olarak hemosit hücrelerinde yayılma kabiliyetleri azalırken apoptotik hücre oranlarında artış olduğu gözlemlendi. Nekrotik hücre oranlarında ise yalnızca SNI uygulamasına bağlı artış olduğu belirlendi. Bu araştırma, gıda koruyucu maddeler arasında yer alan SB, SNa ve SNI'nin model böcek *G. mellonella* larvalarında immünotoksik etkili olduğunu ve memeli türler yerine alternatif model olarak *G. mellonella* larvalarının kullanılabilirliğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Galleria mellonella*, Model Organizma, İmmün Sistem, Gıda Katkı Maddesi

Master Thesis

## SUMMARY

### EFFECTS OF SOME FOOD PRESERVATIVE AGENTS ON THE HEMOCYTE-MEDIATED IMMUNE SYSTEM OF *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) LARVAE

Emine DUMAN ERBAŞ

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Bilal KUTRUP  
2021, 59 Pages

In this study it was aimed to investigate the immunologic effects of sodium benzoate (SB, E211), sodium nitrate (SNi, E250), which were among food preservatives, on the larvae of the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). The last instar larvae were used in analyses of all parameters which were evaluated. For this purpose, median lethal doses of SB, SNa and SNi were applied to the larvae by force feeding method. While total hemocyte counts, prohemocyte and granulocyte ratios decreased in the larvae fed forcibly with SB, SNa and SNi, it was observed that plasmatocyte, spherulocyte, oenocyte ratios and mitotic index increased. In addition, using Sephadex DEAE beads, which were the target of encapsulation and melanization, results showed that encapsulation and melanization decreased, and also nodule formation induced by laminarin injection reduced in the larvae treated with food preservatives. Besides, it was observed that while the spreading ability of hemocyte cells decreased due to food additives, the rate of apoptotic cells increased. Moreover, it was determined that there was an increase in the rate of necrotic cells only due to SNi application. This research shows that SB, SNa and SNi, which are among food preservatives, are immunotoxic in model insect *G. mellonella* larvae, and *G. mellonella* larvae can be used as an alternative model instead of mammalian species.

**Key Words:** *Galleria mellonella*, Model Organism, Immune System, Food Additives



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

- Şekil 1. Böcek hemolenfindeki hemositlerin genel görünüşleri: PR: Prohemosit, PL: Plazmatosit, GR: Granülosit, SP: Siferülosit, O: Oenositoid (Nation, 2002). ..... 8
- Şekil 2. *Galleria mellonella* larva (a-b), pup (c), ergin birey (d) ..... 12
- Şekil 3. Neubauer hemositometre lamı..... 17
- Şekil 4. Neubauer hemositometresi sayım alanı..... 18
- Şekil 5. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozları zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra, larval toplam hemosit sayılarındaki değişim (x 10<sup>6</sup> hücre/ml)..... 25
- Şekil 6. *G. mellonella* larvalarında hemosit tipleri (1: prohemosit, 2: granülosit, 3: plazmatosit, 4: siferülosit, 5: oenosit). (1000 X Büyütme)..... 27
- Şekil 7. *G. mellonella* larval hemositlerinde mitoz bölünme (1000 X Büyütme)..... 27
- Şekil 8. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozlarının zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra larval hemositlerindeki yayılma davranışındaki yüzdesel (%) değişimler..... 28
- Şekil 9. *G. mellonella* larval hemolenfindeki yayılış gösteren hemositlerin mikroskopik görüntüleri (1: yayılan granülosit hücreleri, 2: normal granülosit hücreleri). (400 X Büyütme)..... 28
- Şekil 10. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozlarının zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra, larval iç organlar ve deri üzerindeki nodül sayılarında görülen değişimler..... 29
- Şekil 11. *G. mellonella* larvalarında nodül oluşumu (Gwokyalıya ve Altuntaş, 2019)..... 30
- Şekil 12. Gıda katkı maddeleri ile zorla beslenen *G. mellonella* larvalarında 24 saat sonra belirlenen enkapsülasyon durumları (a: enkapsüle olmamış, b: zayıf enkapsüle olmuş, c: güçlü enkapsüle olmuş) ve melanizasyon (d), 100 X büyütme..... 32
- Şekil 13. 24 saat süresince gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozlarına zorla besleme yöntemi ile maruz kalan larvalara uygulanan boncuk enjeksiyonundan 4. ve 24. saat sonrasında melanizasyon oranlarındaki yüzdesel (%) değişimler ..... 33
- Şekil 14. *G. mellonella* hemositlerinde apoptoz ve nekroz 1) canlı hücreler 2) erken apoptoz hücreleri 3) geç apoptoz hücreleri 4) nekrotik hücreler ..... 35

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

- Tablo 1. *Galleria mellonella* yarı sentetik besiyeri bileşenleri (Altuntaş vd., 2017) ..... 14
- Tablo 2. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozları zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra, larval farklı hemosit tiplerinde görülen yüzdesel (%) değişimler ..... 26
- Tablo 3. 24 saat süresince gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozlarına zorla besleme yöntemi ile maruz kalan larvalara uygulanan boncuk enjeksiyonundan 4. ve 24. saat sonrasında hemositlerde belirlenen enkapsülasyon oranlarındaki yüzdesel (%) değişimler ..... 31
- Tablo 4. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozları zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra larval hemositlerdeki canlılık, apoptotik ve nekrotik durumların yüzdesel değişimi ..... 34

## KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

AO	: Akridin Orange
CAT	: Katalaz
cm <sup>3</sup>	: Santimetreküp
E	: Europe
EB	: Etidyum Bromür
g.mol	: Gram Molarite
GSH	: Glutasyon
LD <sub>50</sub>	: Ortalama Letal Doz
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mm <sup>3</sup>	: Milimetreküp
n	: Örneklem Sayısı
PBS	: Fosfat Buffer Saline
SB	: Sodyum Benzoat
SNa	: Sodyum Nitrat
SNi	: Sodyum Nitrit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
THC	: Toplam Hemosit Sayısı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Dünyadaki insan nüfusu son on yılda ortalama 1 milyara ulaşarak yaklaşık % 11 oranında artış göstermiştir. Bu artışın önümüzdeki on yıl içerisinde daha da fazla olacağı tahmin edilmektedir (URL-1, 2020). İnsan popülasyonunda şimdiye kadar gözlenen artış ve geleceğe yönelik tahminler göz önüne alındığında sağlık, beslenme, çevre ve habitat konularında önemli problemlerin ortaya çıkması kaçınılmazdır. Söz konusu problemlerin giderilmeye çalışılması amacıyla Dünya Sağlık Örgütü (WHO) başta olmak üzere birçok önemli kurum ve kuruluş yeni çözüm yolları aramaktadır. Özellikle, beslenme ile ilişkili, toprak verimliliği, tarımsal faaliyetler, tarımsal ürünlerin hasat edilmesi, depolanması, tüketilebilir formlara dönüştürülmesi ve paketlenmesi gibi besinlerin üretimi ve tüketimi sırasında karşılaşılan problemlerin çözülmesi için önemli araştırmaların yapılması teşvik edilmektedir.

Besin maddelerinin tüketiciye ulaşmadan önce tüketilebilir formda korunması için gerekli önlemlerin alınması bu çalışmalar içinde önemli bir yere sahiptir. Gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla besinlerin depolanması, saklanması veya raf ömrünün uzatılması ve bu esnada zarar görmesinin engellenmesi çoğunlukla çeşitli kimyasal bileşenlerin bir ya da daha fazlasının bir arada kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Özellikle hazır paket halinde sunulan gıdaların çeşitli biyolojik patojenlerden ve fiziksel etmenlerden korunması ile raf ömürlerinin uzaması için gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Resmi gazetede yayınlanan 30 Haziran 2013 tarihli 28693 sayılı Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre, "Gıda Katkı Maddesi: Besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeleri ifade eder." şeklinde tanımlanmaktadır (URL-2, 2020). Uluslararası kuruluşlarca oluşturulan standartlara göre gıda katkı maddelerinin tanınırlığı "Europe" kelimesinin baş harfi olan

*E*'nin kullanımı ile numaralandırılmaktadır. *E* numarası verilen gıda katkı maddelerinde toksikolojik testler tamamlanmış ve zararlılık dozları belirlenmiştir (Yörük ve Danyer, 2016). Gıda katkı maddelerinin çok çeşitli amaçlarda kullanılması bu maddelerin sınıflandırılmasını da gerektirmektedir. Bu nedenle bu maddeler kullanım amaçlarına göre renklendiriciler (*E* 100-180), koruyucular (*E* 200-285, *E* 330), antioksidanlar (*E* 300-321), emülsifiyer ve stabilizatörler (*E* 322-500), asit-baz sağlayıcılar (*E* 500-578), tatlandırıcılar ve koku verenler (*E* 620-637) ile geniş amaçlı gıda katkı maddeleri (*E* 900-927) olacak şekilde gruplara ayrılmaktadır (Çalışır ve Çalışkan, 2003). Gıdalara eklenen koruyucu maddeler (*E* 200-285, *E* 330) gıdaların biyolojik ajanlardan etkilenmesini önleyerek besinlerin kalitesini ve lezzetini korumaktadır (Erkan, 2010). Günümüzde kükürt dioksit ve çeşitli sülfidler, sorbik asit ve tuzları, nitrit ve nitrat bileşikleri, propiyonik asit ve tuzları, asetik asit, benzoik asit ve tuzları en çok kullanılan koruyucu maddeler olarak bilinmektedir (Mamur vd., 2018).

## **1.2. Benzoik Asit**

Benzoik asitler ve benzoatlar genellikle sodyum, kalsiyum veya potasyum ile birleştirilerek kullanılan antimikrobiyal özellikli gıda koruyucu maddeleridir. Bu koruyucular, bakteri, maya ve mantarların membran yapılarını bozma, metabolik reaksiyonları inhibe etme ve organizmaya ait hücre içinde toksik anyon birikimine neden olma yetenekleri sayesinde antimikrobiyal özellik göstermektedirler. E211 olarak numaralandırılan ve benzoik asitin sodyum tuzlarından oluşan sodyum benzoat (SB), kolay uygulama sağlaması, depolama sırasında bakteri ve mantar büyümesini inhibe etmesi nedeniyle margarin, sos, marmelat, jelatin, likör, bira, meyve suları ve alkolsüz içeceklerin korunmasında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Tsay vd., 2007; Zhang ve Ma, 2013). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, SB'nin insan sağlığı için zararlı olmadığı, bağırsaklar tarafından emilerek hippurik asit olarak metabolize edilmesiyle dışarı atıldığı ve vücutta birikime neden olmadığı bildirilmiştir (Barshop vd., 1989). Fakat yapılan bazı çalışmalarda benzoatların kullanılması sonucunda kronik ürtiker, astım, atopik dermatit, rinit, anafilaksi, beyin zedelenmesi, aşırı duyarlılık, kilo kaybı, östrojen hormonlarının artışına bağlı hormon dengesinin bozulması, tümör oluşumu, çocuklarda hiperaktivite gibi

olumsuz sonuçların ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Wibbertmann vd., 2000; Deshpande, 2002; Omaye, 2004; Rangan ve Barceloux, 2009). Bununla birlikte SB tüketimine bağlı olarak hepatosit hücre zarında hasar, mitokondride krista kayıpları, karaciğer ve böbrekte ise disfonksiyon olduğu görülmektedir (Bakar ve Aktac, 2014). İnsan lenfosit hücrelerinin SB ile tedavisinde ise mitotik bölünme indeksinde azalma, mikronukleus frekansı ve DNA hasarında artma ile kardeş kromotidlerde meydana gelen değişimler, bu maddenin klastojenik, mutajenik, anöjenik ve sitotoksik etkilerinin olduğu göstermektedir (Mpountoukas vd., 2008; Yılmaz vd., 2009; Zengin vd., 2011; Mamur vd., 2012). Kemirgen modellerin kullanıldığı çalışmalarda ise beyaz kan hücrelerinin ve hemoglobinin miktarının azaldığı (Eberechukwu vd., 2007), T ve B lenfosit hücrelerinde fonksiyonel tepkimelerin baskılandığı (Yavav vd., 2016), hemoglobin katabolizmasını doğrudan artıran eritrositlerin yıkımını arttırdığı (Femi-Oloye vd., 2020), lenf düğümü hücrelerinde lenfositlerin yapısını değiştirdiği ve hücre zarında hasara (Hu vd., 2008) neden olduğu bildirilmiştir. İnsan beslenmesinde toplam benzoat için günlük kabul edilebilir alım değeri (ADI- Acceptable Daily Intake) 0-5 mg / kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (WHO, 2016). Sıçanlarda ise SB'ye ait LD<sub>50</sub> değerlerinin 4070 mg / kg olduğu bilinmektedir (Fisher, 2014). Ayrıca SB ile tedavi edilen *G. mellonella* larvalarında LD<sub>50</sub> değerinin, sıçanlardaki LD<sub>50</sub> değerleri ile arasında korelasyon olduğu görülmektedir (Maguire vd., 2016).

### 1.3. Nitrit ve Nitrat

Sodyum tuzlarından oluşan sodyum nitrit (E250 - S<sub>Ni</sub>) ve sodyum nitrat (E251 - S<sub>Na</sub>) et ürünleri, balık ve peynirlerde hem koruyucu hem de renk ve lezzet verici olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Russell ve Grahame, 2003). Maya ve mantarların büyümesi üzerinde etkili olmayan nitratlar ve nitritler çoğunlukla antimikrobiyal özelliğe sahiptirler (Cammack vd., 1999). Bazı nitritler sınırlı antimikrobiyal kapasiteye sahiptirler ve bu kapasite kütleme işlemi (gıdanın koruyucu madde ile muamele edilmesi) sırasında nitratların nitritlere dönüşümleri ile ortaya çıkmaktadır (Jouve vd., 1980). İnsan beslenmesiyle alınan nitrat ise ağızda ve midede bulunan bakteriler aracılığıyla nitrite indirgenebilir (Walker, 1990). Özellikle et ürünlerinde kullanılan nitratlar gıda bozulması yapan bakterilerin büyümesini inhibe etmektedir (Sindelar ve Milkowski, 2012). Nitritler ise kötü aromaların

gelişimini engelleme yeteneği sayesinde lezzete aktif olarak katkıda bulunmakta ve kürlenmiş etlerin karakteristik pembe rengini almasını sağlamaktadır (Cammack vd., 1999). Bununla birlikte asetil kolin salınımını engelleyerek kas felcine neden olan ve nörotoksin özelliğe sahip botulinium toksinini üreten *Clostridium botulinum*'un büyümesini engelleyen en önemli gıda koruyucu maddeler nitritlerdir (Smoot ve Pierson, 1982; Nigam ve Nigam, 2010). Bu nedenle nitritlerin çeşitli sağlık sorunlarına neden olmasına rağmen yine de kullanımına izin verilmektedir (Smoot ve Pierson, 1982). Yüksek dozda alınan nitrit, nitrat ve metabolik ürünlerinin sindirim sistemine girdiklerinde *nitrosamin* gibi kanserojen etkileri olan bileşiklere dönüştüğü ve bunun sonucunda karaciğer, akciğer, böbrek, gırtlak, mide ve pankreas kanserlerinin oluşumunda rol oynadıkları bilinmektedir (Omaye, 2004; Erkmn ve Bozoğlu, 2008). Ayrıca, venöz kan basıncını düşürerek hipotansiyon, oksijen tüketiminde azalma ve kan akışında artışa neden olarak dolaşım sistemini de olumsuz yönde etkilemektedir (Omaye, 2004). İnsan lenfosit hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda SNI'nin genotoksik etkisi (Özdemir vd., 2012), SNa'nın ise aktif nötrofiller ve makrofajlar tarafından ROS oluşumunu engellendiği (Deriagina vd., 2003) gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise SNI ve SB karışımının böbrek ve karaciğer dokusunda tümör baskılayıcı gen p53'ü arttırdığı bildirilmiştir (Radwan, 2020; Radwan vd., 2020). Bununla birlikte sıçanlarda yapılan çalışmalarda SNa ve SNI'ye ait LD<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 1267 mg / kg ve 85 mg / kg olduğu bilinmektedir (Fisher, 2014, 2019). Maguire vd., (2016) tarafından yapılan bir çalışmada SNa ve SNI uygulanan *G. mellonella* larvalarında belirlenen LD<sub>50</sub> değerleri ile sıçanlardaki LD<sub>50</sub> değerleri arasında korelasyon olduğu gösterilmektedir. Bununla birlikte, SNa ve SNI uygulanan *Drosophila melanogaster* larvalarında doz artışına bağlı olarak pupal gelişim ile erginleşme sürelerinde gecikmenin olduğu görülmektedir (Atlı vd., 2020). Ayrıca SNa ve benzoik asitin doz artışına bağlı olarak *Caenorhabditis elegans*'ın yaşam süresi, doğurganlık ve fiziksel büyüme üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Saraç ve Sarı, 2019).

#### 1.4. Toksikite Analizlerinde Kullanılan Yeni Model Organizmalar

Yeni nesil terapötik maddeler ile gıda katkı maddelerinin *in vivo* toksisite çalışmalarında geleneksel olarak fareler, sıçanlar, Gine domuzu ve kuşlar gibi çeşitli

omurgalı hayvan türleri kullanılmaktadır (Tsai vd., 2016). Özellikle memeli modellerinin toksisite analizlerinde kullanılması, memeli türlerin genom homologileri, anatomik, fizyolojik ve hücre biyolojilerinin benzerliklerinden kaynaklanmaktadır (Perlman, 2016). Herhangi bir bileşiğin toksik etkisi, bu maddeye maruz kalan canlının degrade edici enzim ya da çeşitli bileşenleri ile pH'a bağlı olarak *in vivo* ortamda gerçekleşen fizyolojik mekanizmalarla azaltılabilir (Desbois ve Coote, 2012). Bununla birlikte, bu tür testlerde kullanılan memelilerin sayısının minimuma indirilmesi, alternatif ve etik olarak kabul edilebilir sistemlerin geliştirilmesinin gerekliliğine dair bir görüş vardır (Browne ve Kavanagh, 2013).

Son on yılda, böceklerde birçok biyolojik araştırmalar için geleneksel model organizmalar gibi kullanılmaya başlanmıştır (Wojda, 2017). Denizler dışında tüm ekolojik nişlere yerleşmiş yaklaşık 1 milyon tür içeren böcekler omurgasız hayvanların çok başarılı bir sınıfıdır. Böceklerin çok çeşitli ortamlarda yaşaması çok yönlü ve oldukça etkin bir doğal immün sisteme sahip olmaları ile ilişkilidir. Omurgalı hayvanlar omurgasızlardan 500 milyon yıl önce ayrılmış olmasına rağmen immün ve gastrointestinal sistemleri arasında çarpıcı benzerlikler bulunmaktadır. Bu korunmuş benzerlikler sonucunda böceklerin geniş bir grubu, patojen virülansı (Kavanagh ve Fallon, 2010; Junqueira, 2012) antifungal ajanların aktivitesinin belirlenmesi (Lionakis ve Kontoyianis, 2005; MacCallum vd., 2013; Maurer vd., 2015), yeni antimikrobiyal ilaçların etkinliğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda memeli türler yerine model organizma olarak kullanılmaktadır (Hamamoto vd., 2004; Rowan vd., 2009; Desbois ve Coote, 2011; Browne vd., 2014). Bununla birlikte pestisitlerin (Büyükgüzel ve Büyükgüzel, 2013), solventlerin (Soos ve Szabad, 2014), nanopartiküllerin (Carmona vd., 2015) ve gıda katkı maddelerinin akut ve kronik toksisite testlerinde alternatif model olarak böceklerin kullanıldığı da görülmektedir (Andretic vd., 2008; Chen vd., 2009; Grunwald vd., 2013). Sonuçta böceklerden elde edilen verilerin memeli modellerindeki verilerle kıyaslanabilir ve uyumlu olması, böceklerin alternatif model haline gelmesine neden olmaktadır (Jander vd., 2000; Cook ve McArthur, 2013; MacCallum vd., 2013).

Böceklerin biyolojik benzerlikleri dışında, deneysel çalışmalar için omurgalı modellere kıyasla acısızlaştırma ve etiksel açılarından da daha avantajlıdırlar. Memeli modelleri ise, bir gereklilik olmalarına rağmen zaman, maliyet, yasal ve etik kısıtlamalar nedeniyle çeşitli dezavantajlara sahip olabilmektedir (McMillan vd., 2015). Çeşitli biyolojik



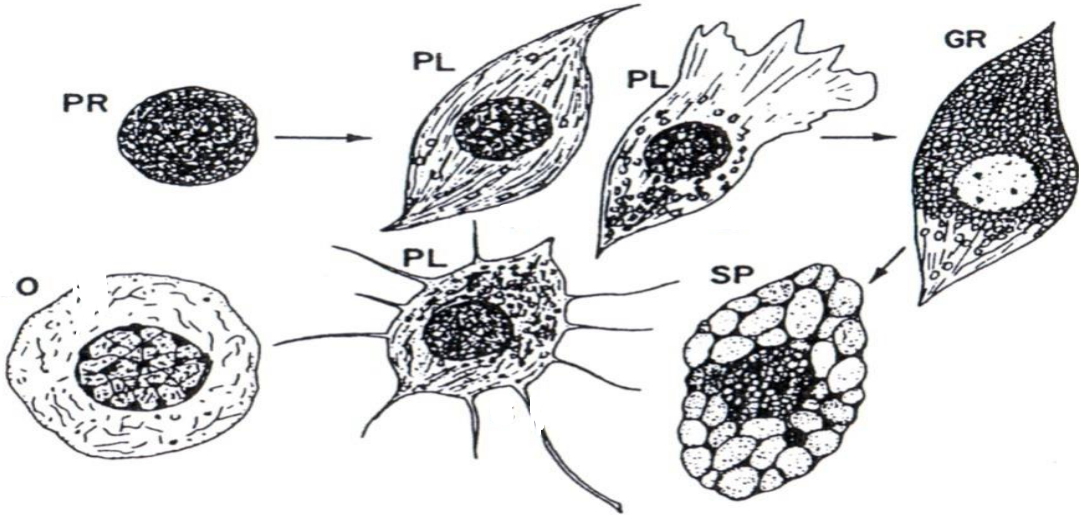
sistemler de omurgasız hayvanlar veya hücre hatları (örneğin zebra balık embriyoları, nematodlar, hayvan hücresi kültürü), memeli testlerine olası alternatif modeller olarak değerlendirilmektedir. Özellikle böcek enfeksiyonu modelleri, memeli modellere göre daha ucuz, daha az zahmetli ve istatistiksel olarak sağlam veriler verdiği için yüksek verimli analizlerde kullanışlı olabilmektedirler (Desbois ve McMillan, 2015) (Cook ve McArthur, 2013). Örneğin Lepidoptera ordosuna ait bazı türler, antifungal ajanların *in vivo* aktivitesinin, mantar patojenlerine ait virülansın değerlendirilmesi ile bu bileşiklerin *in vivo* toksisitesinin belirlenmesi için başlıca kullanılan alternatif modeller arasında yer almaktadır (Maurer vd., 2015). Model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster* (Lionakis ve Kontoyiannis, 2005; Sarıkaya ve Çakır, 2005), *G. mellonella* (Kavanagh ve Fallon, 2010; Kelly ve Kavanagh, 2011; Cook ve McArthur, 2013), *Bombyx mori* (Hamamoto vd., 2004, 2009), *Manducta sexta* (Dean vd., 2004) ve *Romalea microptera* (Johny vd., 2007) en sık kullanılan böcek türleridir. Bununla birlikte *D. melanogaster* (Sarıkaya ve Çakır, 2005; Wu vd., 2010; Coelho vd., 2015), kırmızı un böceği *Tribolium castaneum* (Nakayama vd., 2012; Grunwald vd., 2013), *Apis mellifera* (Ishay ve Painiry, 1979) ve *G. mellonella* (Maguire vd., 2016)'nın gıda katkı maddelerinin toksisite çalışmalarında model olarak kullanıldığı çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir.

Fare, koyun, maymun gibi daha büyük memeli türlerinin insan fizyolojisine ve anatomisine benzer yanları olabilmektedir. Bununla birlikte fizyolojik süreçlerin işleyişi açısından böcekler ve memeliler arasında da benzerlik olabilmektedir. Örneğin böceğe ait hemositler ile memelilere ait nötrofiller arasında yüksek derecede fonksiyonel korunmuşluk olduğu bilinmektedir (Kavanagh ve Reeves, 2004). Ayrıca patojenlerin enfeksiyon oluşturma mekanizmaları (yapışma, invazyon, sistemik yayılma ve bağışıklık yanıtından kaçınma) her iki canlı grubunda da aynıdır. Bu enfeksiyonlara yanıt olarak hem memeliler hem de böcekler kendilerini korumak amacıyla bir dizi mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmaların bazıları (örneğin adaptif bağışıklık sistemi) yüksek derece metazoanlarla sınırlı olmasına rağmen, enfeksiyona karşı fiziksel engeller ile doğuştan gelen bağışıklık sistemleri hem memelilerde hem de böceklerde yaygındır ve yüksek fonksiyonel homoloji göstermektedir (Kemp ve Massey, 2007). Ancak böcekler tüm insan patojenlerinin (örneğin sıtma paraziti) incelenmesi için uygun modeller değildir, yinede uygun şekilde kullanıldığı takdirde araştırmacıya çeşitli faydalar sağlayabilirler. Bu nedenle mikrobiyal patogenezin belirlenmesinde, toksisite testlerinde ve antimikrobiyal tedavilerde böceklerin model sistem olarak kullanımı önemli araştırma konuları arasında girmiştir.

## 1.5. Böceklerde Bağışıklık Sistemi

Memeli hayvanlarda hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemleri yer almaktadır. Doğal bağışıklık fagositler, makrofajlar, lenfositler gibi savunma hücreleri ile gerçekleştirilirken, kazanılmış bağışıklık T lenfosit, B lenfosit ve antikor aracılı bağışıklık belleği ile gerçekleştirilmektedir (Fearon vd., 1997). Böceklerde ise humoral ve hücrel bağışıklık olmak üzere iki tip doğal bağışıklık sistemi yer almaktadır (Hirashima vd, 1990; Faulds, 1991; Canyurt, 1994; Androw vd., 1997). Humoral bağışıklık sistemi, kompleks enzimatik aktiviteler ve bazı antimikrobiyal peptitlerin sentezlenmesi sonucunda hemolenfin pıhtılaşması ya da melanizasyonu ile gerçekleşmektedir (Miller vd., 1993; Canyurt, 1994). Hücrel bağışıklık sisteminde ise hemositler tarafından fagositoz, enkapsülasyon, nodül oluşumu ve koagülasyon gibi hemosit aracılı immün savunma mekanizmaları görülmektedir (Irving vd., 2005; Strand, 2008).

Memeli hayvanların bağışıklık sisteminde yer alan hücreler ve moleküller, lenfoid organlarda üretilmekte kan ya da lenf sistemi ile taşınmaktadır (Alberts, 2002). Kapalı dolaşım sistemi bulunmayan hayvansal organizmalarda ise kan ve lenf sıvılarının bir arada bulunduğu hemolenf sıvısı ve bu sıvıda yer alan hemosit hücreleri bağışıklık sisteminde rol oynamaktadır (Rowley ve Ratcliffe, 1981). Hemolenfte bulunan hemositler çeşitli savunma mekanizmaları ile hücrel bağışıklığa aracılık etmektedirler (Gupta, 1985; Hirashima vd., 1990; Faulds, 1991; Canyurt, 1994). Birçok böcek türünde, hücrel bağışıklıkta rol alan bu hemositler, morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel karakterlerine göre prohemosit, plazmatosit, granüler hücreler (granülosit), siferül hücreler (spherulocyte) ve oenosit (oenositoid) olarak sınıflandırılmaktadır (Gupta, 1985; Vilmos ve Kurucz, 1998; Schmidt vd., 2001; Lavine ve Strand, 2002; Nation, 2002; Silva vd., 2002; Glatz vd., 2004; Turnbull vd., 2004) (Şekil 1).



Şekil 1. Böcek hemolenfindeki hemositlerin genel görünüşleri: PR: *Prohemosit*, PL: *Plazmatosit*, GR: *Granülosit*, SP: *Siferülosit*, O: *Oenositoid* (Nation, 2002).

Düzenli şekilli ve en küçük olan *prohemosit* hücrelerinin aktif mitotik hücreler olduğu ve diğer hemosit hücrelerinin öncüleri olduğu bildirilmiştir (Rowley ve Ratcliffle, 1981; Gupta, 1985; Ribeiro ve Brehelin, 2006; Levin, 2007). Prohemositlerden biraz daha büyük ya da polimorfik yapıda olan *plazmatosit* hücreleri, fagosite edilemeyecek kadar büyük olan yabancı cisimlerin, bakteri topluluklarının veya nekrotik melanize olmuş materyallerin etrafında kapsül ve nodül oluşturmaktadır (Lavine ve Strand, 2002; Ribeiro ve Brehelin 2006). Sitoplazmasında granüller bulunan, sferik ya da oval biçiminde ve fagositozdan sorumlu hemosit tipi ise *granülosit* hücreleridir (Ribeiro vd., 1996; Costa, 2005). Kapsül ya da nodüllerin oluşturulmasında ise içeriğinde bulunan granüller ile plazmatositleri bu bölgelere çekmekte rol aldıkları ve plazmatositlere yardımcı oldukları düşünülmektedir (Pech ve Strand, 1996; Ribeiro ve Brehelin, 2006). İçerisinde asidofilik inklüzyonlar bulunan, oval ya da küresel şekilli *siferul* hücrelerinin bağışıklık sistemindeki rolleri tam olarak bilinmemekle birlikte (Lavine ve Strand, 2002; Ribeiro ve Brehelin, 2006), kütiküler bileşenlerin taşınmasına katıldıkları bildirilmiştir (Wojda, 2017). En büyük boyuta sahip olan *oenosit* hücrelerinin ise Lepidopter türlerine ait canlıların bağışıklık sisteminde ve yaralanmaların iyileşmesinde önemli rol aldıkları bildirilmiştir (Rowley ve Ratcliffle, 1981; Ashida vd., 1988; Ribeiro vd., 1996; Da Silveira vd., 2003; Kanost vd., 2004; Levin, 2007).

Böcekler maruz kaldıkları endojen ya da eksojen kaynaklı ajanlara karşı hücrel savunma tepkimelerini hemositler aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Levin, 2007). Böyle bir durum söz konusu olduğunda enkapsülasyon, melanizasyon, nodulasyon, fagositoz ve koagülasyon olarak adlandırılan önemli immün tepkiler ortaya çıkmaktadır (Hirashima, 1990; Faulds, 1991; Canyurt, 1994; Wharton, 1993). Granülosit aracılığıyla fagosite edilemeyecek boyutta olan biyolojik organizma ya da sentetik ajanların etrafı plazmatosit hücreleri ile kapsüllenmektedir (Rowley ve Ratcliffle, 1981; Götz ve Boman, 1985; Ribeiro vd., 1996; Costa, 2005). Böceklerde bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından olan bu durum *enkapsülasyon* olarak tanımlanmaktadır (Rowley ve Ratcliffle, 1981; Gupta, 1985; Schmidt vd., 2001; Richards ve Edwards, 2002). Böylece böcek tarafından tanınmayan patojenin etrafı, granülosit ve plazmatosit hücreleri tarafından tabakalar halinde sarılmakta ve bu tabakalarda meydana gelen çeşitli seviyelerdeki melanizasyon ile patojen etkisiz hale getirilmektedir (Rowley ve Ratcliffle, 1981; Gupta, 1985; Canyurt, 1994; Androw vd., 1997; Schmidt vd., 2001; Richards ve Edwards, 2002). *Nodülasyon*, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların uzaklaştırılması için lektin aracılığıyla gerçekleştirilen hızlı bir hücrel savunma tepkimesidir (Vilmos ve Kurucz, 1998; Arai vd., 2013). Nodül oluşumu, patojenlere ait spesifik moleküllerin tanınması ve sonrasında plazmatosit ve granülosit hücrelerinin patojene yapışması ile gerçekleşir. Hemositler tarafından yakalanan patojenler melanize edilerek hemosölden atılmaktadır (Lavine ve Strand, 2002; Debnath vd., 2017; Tembhare, 2016). *Melanizasyon* ise yaraların iyileşmesi ve bağışıklık sisteminde hemositler aracılığıyla gerçekleştirilen hem humoral hem de hücrel savunma tepkimelerinde rol oynamaktadır. Melanizasyon süreci melanin öncüsü olan fenilalaninin trozine dönüşmesi ile başlayan melanogenez reaksiyonları ile gerçekleşmektedir (Santoyo ve Aguilar-Cordoba, 2011). Böylece patojenlerin melanin ile kaplanarak ölümüne neden olabilecek zararlı metabolitlerin oluşturulması ve patojenin hemolenften izole edilmesi için önemli bir immün reaksiyondur (Yassine vd., 2012).

Hücrel savunma sisteminde rol alan hemositler, patojen ya da toksik maddelerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmaya çalışırken kendi bünyelerinde de değişikliğe uğramaktadırlar. Hemositlerde meydana gelen bu değişimlerin apoptoz (programlı hücre ölümü), nekroz, hücre şekillerinin bozulması ve mitotik indekslerinde artışlara neden olduğu bildirilmiştir (Gupta, 1985; Pech ve Strand, 2000; Le vd., 2003; Teramoto ve Tanaka, 2004; Altuntaş vd., 2012; Gwokyalaya ve Altuntaş, 2019). Bu hücrel değişimlerden *apoptoz*, hücre içeriklerinin sitoplazma dışına verilmeden ve çevresindeki diğer hücreleri etkilemeden

programlı bir biçimde intihar etmesi olayıdır (Aldırmaz, 2004; Halliwell ve Gutteridge, 2007). Bu olay sırasında hücrelerde ve sitoplazmik içerikte büzülme, sitoplazmik yapıda balonlaşma, çekirdek zarında heterokromatin birikimleri, kromatinde yoğunlaşma, DNA'nın parçalanması olayları meydana gelmekte, sonrasında hücre küçük fragmentlere ayrılarak apoptotik cisimcikleri oluşmaktadır (Haschek ve Rousseaux, 1998; Pech ve Strand, 2000; Terahara vd., 2003). Böceklerde apoptotik hücelere ait morfolojik özellikler hücrede küçülme, hücre zarında kabarcıklaşma, kromatinde yoğunlaşma ve DNA'nın parçalanması ile karakterize edilmektedir (Pech ve Strand, 2000; Terahara vd., 2003). *Nekroz* ise organizmanın patolojik olguları sonrasında oluşan, nekrotik hücrenin çevresindeki diğer hücelere zarar verecek bir biçimde patolojik ölümdür. Komşu hüceleri etkilemesi, nekrotik hücre zarının stabil olmayan bir biçimde hasara uğraması ile sitoplazmik içerikteki çeşitli enzimler ve pro-oksidadanlardan kaynaklanmaktadır. Nekrotik hücre, sitoplazmik vakuollerin artışı, organellerin şişmesi, mitokondri, peroksizom, lizozom ve hücre membranlarının yapısal bütünlüğünün bozulması ile karakterize edilmektedir (Kumar vd., 2003; Halliwell ve Gutteridge, 2007).

Ksenobiyotiklere maruz kalan böcekler ile yapılan çeşitli çalışmalar, hemositlerin sayısında değişimlerin, şekilsel bozulmanın, melanizasyonun, apoptotik veya nekrotik ölümlerin olduğunu göstermektedir (Ratcliffe ve Rowley, 1975; Gupta, 1979; Shapiro, 1979; Christensen vd., 1989). Yapılan çalışmalarda  $\beta$ -ecdysone'a maruz kalan *Spodoptera litura* (Ahmad, 1993), methoprene'e maruz kalan *Papilio demoleus* (Sendi ve Salehi, 2010) ile azadirachtin'e maruz kalan *G. mellonella* larvalarında (Er vd., 2017) toplam hemosit sayılarının azaldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, methoprene uygulanan *P. demoleus* larvalarında plazmatosit, adiposit ve siferülosit sayılarının önemli ölçüde azaldığı, hemositlere ait sitoplazma, hücre zarı ve çekirdek yapılarında da ciddi patolojik değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir (Sendi ve Salehi, 2010). Doğal insektisit olarak kabul edilen azadirachtin ile tedavi edilen *G. mellonella* larvalarında ise hemositlerin fagositoz kapasitesinde ve laminarin kaynaklı nodül oluşumunda azalmanın olduğu belirlenmiştir (Er vd., 2017). Bu çalışmalara benzer şekilde okadaic acid ile muamele edilen *G. mellonella*'da hemosit canlılığının ve dolaşımında yer alan hemosit sayılarının azaldığı bildirilmiştir (Coates vd., 2018). Gwokyalıya ve Altuntaş (2019) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise artan borik asit konsantrasyonuna bağlı olarak *G. mellonella* larvalarında toplam hemosit sayısında, prohemosit - plazmatosit - oenosit oranlarında, canlı hücre sayısında, nodül ve kapsül oluşturma yeteneği ile melanizasyonda azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca

aynı çalışmada apoptotik ve nekrotik hücre oranlarının da konsantrasyona bağlı olarak arttığı görülmektedir. Bu sonuçların aksine yapılan bazı çalışmalarda da toplam hemosit sayılarında artış olduğu belirlenmiştir. Örneğin, bitki gelişim düzenleyicisi olan Gibberellik asit'in *G. mellonella* larvalarında doza bağlı olarak toplam hemosit sayısının, mitotik indeksin, geç apoptotik indeksin ve nekrotik indeksin artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, GA<sub>3</sub>'ün melanizasyon ve kapsülleme yanıtlarını değiştirdiği ancak farklı hemosit tipleri üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Altuntaş vd., 2012). Başka bir çalışmada ise indol-3-asetik aside maruz kalan küçük balmumu güvesi *Achoria grisella* larvalarında nekrotik ve geç apoptotik indeksleri azalmış, toplam hemosit sayısı ve erken apoptotik indeksleri doza bağlı bir şekilde artmıştır (Çelik vd., 2017). Gıda katkı maddesi olarak kullanılan potasyum nitrata maruz kalan *G. mellonella* larvalarında ise toplam hemosit sayılarında artış olduğu bildirilmiştir (Maguire vd., 2017).

#### **1.6. Model Böcek *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)**

Büyük balmumu güvesi *G. mellonella* Ülkemizde ve Dünyada arı yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelerde, arı kolonileri üzerinde olumsuz etkilere yol açan küresel zararlılar arasında ikinci sırada yer almaktadır (Esin, 1990; Selçukoğlu, 1999). Özellikle bu türe ait larvaların arı kovanı üzerinde neden olduğu olumsuz etkiler nedeniyle ortaya çıkan ekonomik sorunlar neticesinde yaşam öyküsü, biyolojisi, davranışı, ekolojisi, moleküler biyolojisi, fizyolojisi ve kontrolü üzerine birçok araştırma yapılmıştır (Altuntaş vd., 2012; Salem vd., 2014; Er vd., 2017, Maguire vd., 2017; Gwokyalya ve Altuntaş, 2019, Yücel ve Kayış, 2019). Arıcılıktaki öneminin yanı sıra, anatomik ve fizyolojik özellikleri, yüksek çoğalma yeteneği ve laboratuvar koşullarında kolayca kültürü yapılan bir tür olması nedeniyle böcek fizyolojisi ve insan patojenleri üzerine yapılan çalışmalarda model organizma olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Fallon vd., 2012; Browne ve Kananagh, 2013; Cook ve Mcarthur, 2013). *G. mellonella*'nın memeli organizmalar yerine model olarak kullanıldığını gösteren bazı çalışmalarda;

- ✓ çeşitli patojenlerin virülans değerlendirmeleri için,
- ✓ fare ve memeli hücre kültürü ile karşılaştırmalı toksisite analizleri için,

antibakteriyel ve antifungal çalışmalarda *in vivo* model olarak kullanıldığı bilinmektedir (Kavanagh ve Fallon, 2010; Kelly ve Kavanagh, 2011; Cook ve McArthur, 2013; Maguire vd., 2016).

### 1.6.1. Sistematikteki Yeri

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Lepidoptera

Üstfamilya: Pyraloidea

Familya: Pyralidae

Altfamilya: Galleriinae

Cins: *Galleria* Fabricius, 1798

Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Şekil 2)



Şekil 2. *Galleria mellonella* larva (a-b), pup (c), ergin birey (d)

## 1.7. Amaç ve Hipotez

Daha önce *G. mellonella* ile yapılan çalışmalarda çeşitli kimyasal ajanların neden olduğu immünojik değişiklikler bildirilmiştir. Ancak gıda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat, sodyum nitrat ve sodyum nitritin, bu model organizma üzerinde meydana getirmiş olduğu toksisitesinin immün sistemi üzerindeki olası etkilerini gösteren bir çalışmaya açık literatürde rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmanın hipotezi, gıda katkı maddelerinden SB, SNa ve SNi'nin model organizma *G. mellonella* larvalarının hücresel immün sistemi üzerinde neden olacağı değişimlerin analizlenmesidir. Bu nedenle, Maguire vd., (2016) tarafından yapılan çalışmada SB, SNa ve SNi'ye ait belirlenen ortalama letal doz (LD<sub>50</sub>) değerleri kullanılarak, bu maddelerin model organizma *G. mellonella* larvalarındaki hemosit aracılı savunma mekanizmaları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

SB, SNa ve SNi'nin LD<sub>50</sub> değerleri son evre *G. mellonella* larvalarına zorla besleme (force feeding) yöntemi ile uygulanarak larval hemositler ve hemosit aracılı immün tepkimeler üzerindeki fizyolojik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, tez çalışması kapsamında SB, SNa ve SNi'nin daha önceden belirlenen ortalama letal dozlarına göre larvalardaki toplam ve farklı hemosit sayıları, hemositlerin yapışma kabiliyeti, hemosit ölümü (apoptoz-nekroz), mitotik indeks, nodulasyon ve enkapsülasyon-melanizasyon mekanizmaları üzerindeki etkileri tespit edilmiştir. Böylece tez kapsamında SB, SNa ve SNi'nin model böceğin larval doğal immün sistemi üzerindeki etkilerinin anlaşılması ile bu maddelerin immünotoksik etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesi ve literatüre kazandırılması hedeflenmiştir.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. *Galleria mellonella* Stok Kültürlerinin Kurulması

*Galleria mellonella* stok kültürlerinin oluşturulması için Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Hayvan Fizyolojisi laboratuvarından temin edilen pup evresindeki canlılar kullanıldı. Kültürün devamlılığının sağlanması Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde,  $28 \pm 2$  °C sıcaklık,  $\% 60 \pm 5$  bağıl nem ve sürekli karanlık ortam koşullarına sahip iklimlendirme kabini (Binder KMF 720) içerisinde gerçekleştirildi.

Tablo 1. *Galleria mellonella* yarı sentetik besiyeri bileşenleri (Altuntaş vd., 2017)

Malzeme	Miktar
Kepek	430 g
Bal peteği	100 g
Bal	75 ml
Gliserin	150 ml
Distile su	75 ml
Polen	20 g

Stok kültürlerin oluşturulması için *G. mellonella* puplarından ergin bireyler elde edilerek yeni ırkların yetiştirilmesi sağlandı. Bunun için, içerisinde yarısentetik besiyeri (Tablo 1) bulunan 1 litrelik cam kavanozlara 5 adet dişi ve 5 adet erkek ergin birey konuldu. Erginlerin çiftleşme ve yumurtlama süreçleri gün aşırı olarak takip edildi. Yumurtadan çıkan ilk evre larvaların görülmesi ile başlayan süreçte atıkların uzaklaştırılması, yeni besin eklenmesi ve popülasyon yoğunluğunun azaltılması amacıyla yeni kavanozlara aktarılması

işlemleri haftada 3 kez olacak şekilde gerçekleştirildi. Bakımlar sırasında son evreye ulaşan larvalar, içinde katlanmış kağıt bulunan 0,5 litrelik pup kavanozlarına (en fazla 20 adet) konularak delikli kapaklar ile kapatıldı. Her bir pup kavanozu bir hafta sonra kontrol edildi ve pup evresine giren bireyler 0,5 litrelik boş kavanozlara alınarak üzerleri gazlı bezle kapatıldı. Bu kavanoz içerisinde yer alan puplardan erginleşen bireylerin cinsiyet ayrımları yapılarak yeni kültürlerin oluşturulması sağlandı. Bu işlemlerin tümünde hazırlanan larva, pup ve ergin birey kavanozları  $28 \pm 2$  °C sıcaklık, %  $60 \pm 5$  bağıl nem ve sürekli karanlık ortam koşullarına sahip iklimlendirme kabini içerisinde yetiştirildi. Her işlem basamağında kullanılan kavanozlar ise hava akışını engellemeyecek şekilde gazlı bezler ve delikli kapaklar ile kapatıldı.

## 2.2. Sodyum Benzoat, Sodyum Nitrat ve Sodyum Nitritin Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan gıda katkı maddelerinden sodyum benzoat (SB,  $144,11 \text{ g.mol}^{-1}$ ), sodyum nitrat (SNa,  $84,995 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ve sodyum nitrit'e (SNI,  $68,995 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ait sırasıyla  $9 \times 10^{-6}$ ,  $18 \times 10^{-6}$  ve  $5 \times 10^{-6}$  M olan ortalama letal doz ( $LD_{50}$ ) değerleri Maguire vd.,'nin (2016) yapmış olduğu çalışmada bildirilmiştir. SB, SNa ve SNI'nin toz halindeki ticari formları, fosfat tamponu (PBS, pH: 7,4, Sigma, St. Louis, Mo) içerisinde çözdürülerek  $LD_{50}$  değerlerinin hazırlanmasında kullanıldı. Deney setlerinin oluşturulmasında SB, SNa ve SNI'ye ait hazırlanan solüsyonlar kullanılırken, kontrol setlerinde PBS (pH: 7,4) ve distile su kullanıldı.

## 2.3. Zorla Besleme (Force Feeding) Yöntemi

Deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesi amacıyla kültür içerisinde seçilen son dönem larvaları ayrı bir kavanoz içerisine alındı. Ağırlıkları tartılan son evre larvalar ( $0,17 \pm 0,01$  g) içerisinde besiyeri bulunmayan petri kaplarına ( $15 \times 60$  mm) alındı. Bu şekilde besinsiz ortamda bırakılan larvalar 3 saat boyunca iklimlendirme kabini içerisinde bekletildi. Böylece zorla besleme (force feeding) yapabilmek için aç kalan larvaların ağızlarının kolay

bir şekilde açılması sağlandı (Dere vd., 2015). Deney ve kontrol setlerinin kurulması amacıyla kültürden elde edilen ve aç olan larvalar % 70'lik etanol emdirilmiş pamuk üzerinde sterilize edildikten sonra 2 dakika kuru buz üzerinde anestezi edildi. Anestezi işlemi sonrasında buzdan alınan her bir larvaya insülin iğnesi (1 ml'lik) ile ağızdan girilerek özefagusuna 20 µl hazırlanan solüsyon maddelerden bırakıldı. Zorla besleme işleminden sonra larvaların ağız bölgesinde kanama veya kusma olup olmadığı kurutma kâğıdı üzerinde kontrol edildi. Bu işlemin ardından her bir larva içerisinde 2 g yarı sentetik besiyeri bulunan petri kaplarına aktarıldı ve immün sistem değişikliklerinin belirleneceği deneysel çalışmalar öncesinde 24 saat boyunca iklimlendirme kabininde bekletildi.

#### **2.4. Sodyum Benzoat, Sodyum Nitrat ve Sodyum Nitritin *G. mellonella* Larvalarının Hemositleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi**

Kontrol (PBS ve distile su) ve deney (SB, SNa ve SNi'nin LD<sub>50</sub> değerleri) solüsyonları ile zorla beslenen larvaların her birinden elde edilen hemositlerde toplam ve farklı hemosit sayıları, hemositlerin yapışma kabiliyeti, hemosit ölümü (apoptoz-nekroz), nodulasyon, enkapsülasyon-melanizasyon ve mitotik indeks analizleri yapıldı. Bu amaçla, zorla besleme yöntemi sonrasında deney ve kontrol gruplarında bulunan larvalardan 24 saat sonra hemolenf toplandı. Hemolenf toplamadan önce larvalar % 70'lik etanol emdirilmiş pamuk üzerinde sterilize edildikten sonra hareket yeteneklerinin azaltılması amacıyla kısa bir süre buz üzerinde anestezi edildi. Bu işlemin ardından larvaların üçüncü ön bacak bölgesi ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delindi. Yapılacak olan analizlere göre her bir kontrol ve deney grubu larvalarından uygun miktarda hemolenf, mikropapiller tüp (Sigma, St. Louis, Mo) yardımıyla toplandı. Toplanan hemolenf örnekleri uygulanacak yöntemlere göre soğuk tampon veya pıhtılaşma önleyici feniltüre içeren ve buzda bekletilen mikrotüplere alındı. Tüm yöntemlerde larvalardan alınan hemolenf örnekleri bekletilmeden hemen kullanıldı.

### 2.3.1. Toplam Hemosit Sayısı

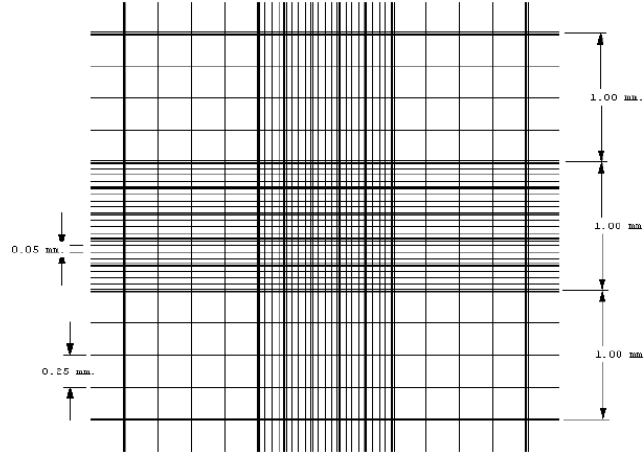
Gıda katkı maddelerine ait ortalama letal dozlar ile kontrol solüsyonlarının uygulandığı larvalarda toplam hemosit sayımlarının gerçekleştirilmesi amacıyla her bir larvadan 4 µl hemolenf mikropipet tüp yardımıyla toplandı. Elde edilen hemolenf soğuk buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 36 µl pıhtılaşma engelleyici solüsyon (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na<sub>2</sub>EDTA ve 0,041 M sitrik asit, pH: 4,5) bulunan mini santrifüj tüpüne aktarıldı (Altuntaş vd., 2012). Hemositlerin homojen dağılımı için mikropipet ile birkaç kez pipetaj işlemi yapıldı. Bu işlemin sonrasında alınan 10 µl hücre süspansiyonu (1:10) 0,100 µm derinliğe sahip Neubauer Hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer; Superior, Germany) yüklendi ve Olympus BX51 marka Faz – Kontrast mikroskopunda hücre sayımları yapıldı. Her bir deney ve kontrol grupları için 3 tekrarlı olmak üzere 15'er larva kullanıldı (n = 45). Toplam hemosit sayımı sonrasında elde edilen veriler, Neubauer hemositometre'nin alan ve hacim özellikleri ile sulandırma katsayısı göz önünde tutularak hemosit sayısı *hücre/ml* olarak ifade edildi. Böylece toplam hemosit sayısı *hücre x 10<sup>6</sup> (hücre/ml)* olarak ifade edildi.



Şekil 3. Neubauer hemositometre lamı

Bu hesaplamada, toplam hücre sayımı için kullanılan Neubauer hemositometresi (Şekil 3), üzerinde iki adet sayım alanı bulunan özel bir lamdır. Lamelin kapatılmasının ardından her iki sayım alanına da konulan 10 µl'lik hücre süspansiyonunun sayımı için, sayım alanlarının orta kısmında yer alan karelerin içerisindeki hemositler sayıldı. Sayım için 25 adet orta büyüklükteki karelerin içerisinde yer alan 16 küçük karelere düşen hemositler

kullanıldı. Hücre sayımlarının yapıldığı bu alan (büyük kare)  $1 \text{ mm}^2$ 'lik alana sahiptir (Şekil 4).



Şekil 4. Neubauer hemositometresi sayım alanı

En büyük ( $1 \text{ mm}^2$ 'lik) karenin hacmi=  $1 \times 1 \times 0.1 = 0.1 \text{ mm}^3$

$0.1 \text{ mm}^3 = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ ml}$

Milimetrede bulunan toplam hücre sayılarının hesaplanmasında ise aşağıda verilen formül kullanıldı;

$$\frac{\text{Hücre sayısı}}{\text{ml}} = \text{Büyük karede sayılan hücre sayısı} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times 10000$$

### 2.3.2. Farklı Hemosit Sayıları ve Mitotik İndeks

Farklı hemosit sayılarının belirlenmesi Altuntaş vd. (2012) tarafından uygulanan yöntemle gerçekleştirildi. Gıda katkı maddelerine ait solüsyonlar ile kontrol solüsyonları uygulanan larvaların her birinden alınan  $15 \mu\text{l}$  hemolenf yayma preparat yöntemi ile lam üzerine yayılarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan hemolenf örnekleri metanol: asetik asit (3:1)

çözeltisi içerisinde 5 dakika boyunca fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından kuruyan lamalar tampon çözelti (PBS, pH: 7,4) içerisinde hazırlanan % 5'lik Giemsa (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution) boya ile 15 dakika boyunca muamele edildi. Boyama süresi sonrası lam üzerindeki fazla boyanın uzaklaştırılması için distile suyla yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama sonrası kuruyan preparatların kalıcı hale getirilmesi amacıyla üzerleri entellan ile kapatıldı. Farklı hemosit tiplerinin belirleneceği preparatlar Olympus CX31 marka ışık mikroskobu altında her bir larva için rastgele seçilen on farklı alanda toplam 500 hücre olacak şekilde sayıldı.

Mitotik indeksin belirlenmesinde de Giemsa boya ile hazırlanan preparat örnekleri kullanıldı. Bu amaçla hemosit hücrelerinde görülen mitoz bölünme evrelerinden profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinin sayımları yapıldı. Farklı hemosit tipleri ve mitotik indeks için kontrol ve deney gruplarına ait analizler her tekrarda 15 adet birey olacak şekilde 3 kez tekrar edildi (n = 45).

### 2.3.3. Hemosit Yayılması

SB, SNa ve SNi'ye ait LD<sub>50</sub> ve kontrol solüsyonları uygulanan larvaların hemositlerinde yayılma kabiliyetlerinin belirlenmesi amacıyla her bir larvadaki 4 µl hemolenf alınarak, kuru buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 20 µl PBS (pH: 7,4) bulunan mini santrifüj tüplerine aktarıldı. Elde edilen karışımın homojen dağılımı için birkaç kez pipetaj işlemi gerçekleştirildi. Pipetaj işlemi sonrası hazırlanan karışım içerisinden 20 µl alınarak daha önceden alkol ile temizlenmiş olan lam üzerine aktarıldı. Hazırlanan preparatlar hızlı bir şekilde humid chamber (nem çemberi, Sigma, H6644) içerisine yerleştirildi ve hücrelerin yapışması amacıyla 29 ± 1 °C etüv içerisinde 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası distile su ile yıkanan preparatlar kurutulduktan sonra tampon çözelti (PBS, pH: 7,4) ile hazırlanan % 5'lik Giemsa (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution) boya ile 15 dakika boyunca boyamaya bırakıldı. Boyama işlemi sonrası distile su ile yıkanan ve kurutulan preparatlar kalıcı hale getirilmek amacıyla entellan ile kapatıldı. Hücre yayılma oranının belirlenmesi için hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Olympus CX31) altında incelendi ve her bir larvaya ait preparatta rastgele seçilen beş farklı alanda yayılma gösteren hücreler dahil toplam 500 hücre sayıldı. Tüm

uygulamalarda 15 adet larva olacak şekilde 3 tekrarlı deneyler gerçekleştirildi (n = 45). Hücre yayılma oranları yüzde veriler olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Hücre yayılması} = \frac{\text{yayılmış hücre sayısı}}{\text{toplam hücre sayısı}} \times 100$$

#### 2.3.4. Nodülasyon

*G. mellonella* larvalarında nodül oluşumunun indüklenmesi Laminarin (Sigma, St. Louis, Mo) aracılığıyla Gwokyalıya ve Altuntaş (2019) tarafından gerçekleştirilen yöntemle yapıldı. Bu amaçla fosfat tamponu (PBS, pH: 7,4) ile hazırlanan 10 mg/ml stok laminarin çözeltisi kullanıldı. Gıda katkı maddeleri solüsyonları ve kontrol solüsyonları ile zorla besleme uygulamasından 24 saat sonra, sterilize edilen ve 2 dakika buz üzerinde anestezi edilen her bir larvanın arka bacağından 5 µl (50 µg laminarin) taze laminarin solüsyonu enjekte edildi. Enjeksiyon işlemi sonrası nodül oluşumunun gerçekleşmesi için 4 saat boyunca iklimlendirme kabini koşullarında inkübasyon gerçekleştirildi (Gwokyalıya ve Altuntaş, 2019). İnkübasyon sonrası -20 °C'de 10 dakika bekletilen ve donmuş olan larvaların dış yüzeyleri % 70 alkol ile dezenfekte edildi. Stereo mikroskop (Olympus SZ61) altında disekte edilen her bir larvada hemolenf, yağ dokusu ve diğer iç organlarındaki koyulaşan nodüller ile deri üzerindeki nodüllerin sayımları gerçekleştirildi. Tüm uygulamalarda 10 adet larva olacak şekilde deneyler 3 kez tekrar edildi (n = 30).

#### 2.3.5. Enkapsülasyon ve Melanizasyon

Gıda katkı maddelerinin *in vitro* enkapsülasyon davranışları üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla Altuntaş vd. (2012) tarafından geliştirilen yöntemle göre Sephadex DEAE A-25 (40-120 µm çap) kromatografi boncukları kullanıldı. Boncukların larval diseksiyonda kolayca tespit edilebilmesi amacıyla taze fosfat tamponu (PBS, pH: 7,4) ile hazırlanan % 1'lik Coomassie mavisi (Brilliant Blue G Sigma) boyası kullanıldı. Hazırlanan boya solüsyonu içerisine konulan Sephadex DEAE A-25 boncukları 1 saat bekletildi ve

ardından fazla boyanın uzaklaştırılması için PBS ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Deney ve kontrol gruplarına yapılan zorla besleme uygulamasından 24 saat sonra her bir larvaya boyanmış olan boncuk enjeksiyonu gerçekleştirildi. Bu işlem için içerisinde 15-20 Sephadex A-25 boncuğu bulunan 10 µl PBS, Hamilton şırınga (Sigma, 50 µl'lik, 22 gauge enjektör) ile larvaların arka bacağından enjekte edildi. Enjeksiyondan 4 ve 24 saat sonra stereomikroskop (Olympus SZ61) altında disekte edilen larvaların tüm vücut bölgeleri incelendi ve bulunan boncuklar ince uçlu diseksiyon iğnesi ile alınarak üzerinde 1 damla PBS bulunan lam üzerine aktarıldı. Elde edilen boncuklar Faz – Kontrast mikroskobu (Olympus BX51) altında incelenerek hemositlerin enkapsülasyon davranışları tespit edildi. Enkapsülasyon davranışlarının tespiti için boncuklarda şu özellikler incelendi;

- Etrafında hemosit bulunmayan veya üzerinde birkaç hemosit bulunan boncuklar *enkapsüle olmamış*,
- Üzerinde 4 - 9 hemosit katmanı bulunan boncuklar *zayıf enkapsülasyon*,
- Üzerinde 10 ve daha fazla hemosit katmanı bulunan boncuklar *güçlü enkapsülasyon* olarak değerlendirildi (Richards ve Dani 2008, Uçkan vd., 2010).

Bununla birlikte enkapsülasyona uğrayan boncuklarda mavi rengin kahverengi-siyaha dönmesiyle oluşan melanizasyon durumları da yüzde olarak hesaplandı. 4 ve 24 saate ait enkapsülasyon ve melanizasyon için tüm uygulamalarda 10'ar larva olacak şekilde 3 tekrarlı deneyler gerçekleştirildi (n = 30).

### 2.3.6. Hücre Ölümü (Apoptoz ve Nekroz)

SB, SNa ve SNi uygulanan larvaların hemositlerinde meydana gelen hücre ölümlerinin belirlenmesi apoptotik ve nekrotik hücrelerin tespit edilmesiyle gerçekleştirildi. Hemositlerde meydana gelen apoptoz ve nekroz durumlarının mikroskopik olarak değerlendirilmesi için Altuntaş vd. (2012) tarafından belirlenen yapı, boyut ve renk parametreleri kullanıldı. Deney solüsyonları ve kontrol solüsyonları ile zorla beslenen



larvaların her birinden 24 saat sonra 5 µl hemolenf toplandı. Toplanan hemolenf örnekleri içerisinde 5 µl akridin orange (100 µg / ml PBS) ve 5 µl etidyum bromür (100 µg / ml PBS) boya karışımı bulunan mini santrifüj tüplerine aktarıldı. Homojen bir karışımın elde edilmesi için birkaç kez pipetaj işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından elde edilen toplam solüsyon (15 µl) hızlı bir şekilde daha önceden % 70 alkol ile temizlenmiş olan lam üzerine yayıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM6000 B marka floresans mikroskobunda mavi ışıkta ve karanlık ortam koşullarında incelendi. Tüm uygulamalarda her bir larva için rastgele seçilen on farklı alanda toplam 300 hücre olacak şekilde apoptotik ve nekrotik hücre sayımları gerçekleştirildi. Hücre ölümünün analizi için tüm uygulamalarda 10 larva olacak şekilde 3 tekrarlı deneyler gerçekleştirildi (n = 30).

Preparatların incelemeleri sırasında hemosit hücrelerinin AO / EB (Acridine Orange/ Ethidium Bromide) karışımı ile boyanma özelliklerine göre sınıflandırma işlemleri gerçekleştirildi. Apoptotik indeksin belirlenmesi amacıyla kullanılan AO, canlı ve ölü hücrelerin içerisine girebilecek özellikte ve çift zincirli DNA ile bağlandığında yeşil renkli floresans, tek zincirli RNA ile bağlandığında ve lizozomlarda birikmesi sonucunda kırmızı veya turuncu renkli floresans yaymaktadır (Kosmider vd., 2004). EO ise membran bütünlüğü bozulan hücrelerde DNA'ya bağlanarak kırmızı renkte floresans yaymaktadır (apoptozisin geç evresi ve nekroz). Bu özelliklere göre hücrelerin durumlarına ait 4 farklı sınıflandırma şu şekilde yapıldı (Cendoroglu vd., 1999; Kosmider vd., 2004):

- Yeşil nükleus, turuncu veya kırmızı sitoplazma; *Canlı hücreler*
- Parlak yeşil nükleus, kromatin yoğunlaşması ve fragmantasyonu, hücre bütünlüğü bozulmamış; *Erken apoptozis*
- Turuncu renkte nükleus, kromatin yoğunlaşması ve fragmantasyonu, hücre bütünlüğü bozulmuş; *Geç apoptozis (sekonder nekroz veya apoptotik nekroz)*
- Turuncu renkte nükleus, membran bütünlüğü bozulmuş; *Nekroz*

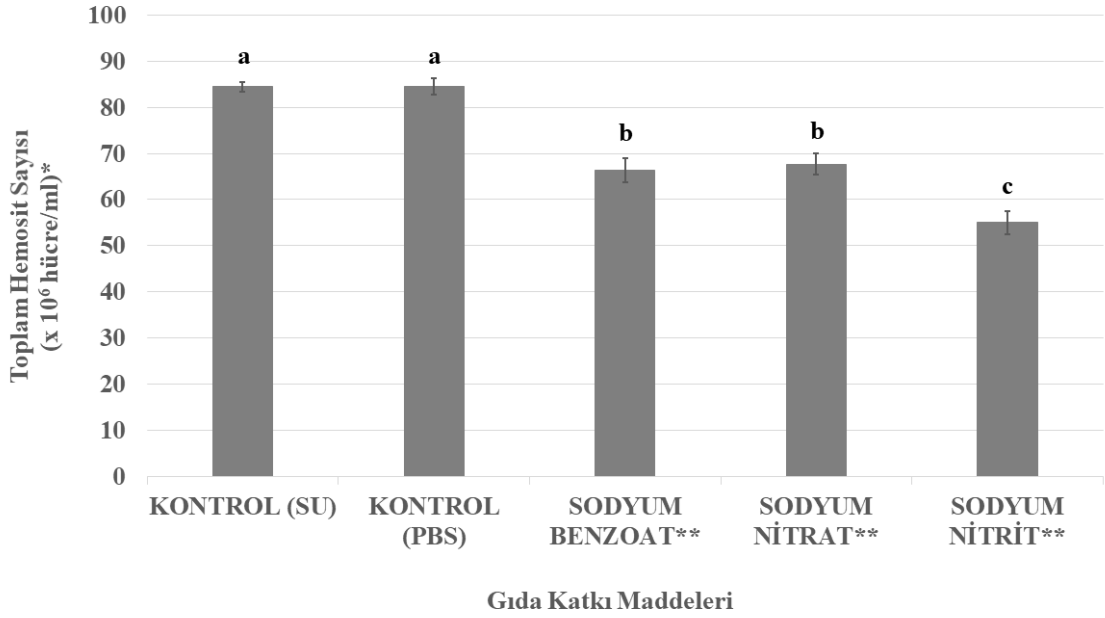
### 2.3.7. İstatistiksel Analizler

Zorla besleme yöntemi ile uygulanan SB, SNa, SNi ve kontrol gruplarının immün sistem üzerine etkilerinin araştırılmasında toplam ve farklı hemosit sayıları, hemositlerin yapışma kabiliyeti, hemosit ölümü (apoptoz-nekroz), nodulasyon, enkapsülasyon-melanizasyon ve mitotik indeks analizlerine ait veriler kullanıldı. 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. Farklı hemosit sayımları, hücre yayılması, enkapsülasyon, melanizasyon, apoptoz ve nekroz verileri yüzde olarak hesaplandığından, bu verilere ait yüzde oranları Arcsin dönüşümleri yapılarak doğrusal hale getirildi. Bu işlemin ardından tüm verilerin Lavene's testi ile normal dağılıp dağılmadıkları belirlendi. Yapılan deneysel analizler sonucunda normal dağılım gösteren nodülasyon, hücre yayılması, apoptoz, plazmatosit-granülosit-siferülosit oranları ile melanizasyon verileri için One Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) uygulanarak, LSD (Least Significant Difference) ile gruplar arası güvenilirlik testleri gerçekleştirildi. Normal dağılıma sahip olmayan toplam hemosit sayısı, nekroz, oenosit-prohemosit oranları, mitotik indeks ve enkapsülasyona ait verilerin istatistiksel farklılıklarını belirlemek için ise Kruskal Wallis ve Mann Whitney testleri yapıldı. Deneylerde elde edilen tüm sonuçlar, % 95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi ( $p < 0.05$ ).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Toplam Hemosit Sayısı

*G. mellonella* son dönem larvalarına LD<sub>50</sub> olarak zorla besleme yöntemi ile uygulanan SB, SNa ve SNi'nin toplam hemosit sayıları üzerindeki etkileri Şekil 5'te gösterilmektedir. Toplam hemosit sayılarının distile su ve PBS ile yapılan kontrol gruplarında sırasıyla 84,46 ± 1,08 ve 84,48 ± 1,72 x 10<sup>6</sup> hücre/ml, SB, SNa ve SNi maddelerinin uygulama sonrasında ise sırasıyla 66,39 ± 2,62, 67,69 ± 2,23 ve 54,98 ± 2,51 x 10<sup>6</sup> hücre/ml olduğu tespit edildi. Kontrol grupları arasında istatistiksel anlamda herhangi bir fark olmadığı belirlenirken, gıda katkı maddelerinin tümünde toplam hemosit sayılarının kontrol gruplarına kıyasla önemli derecede azaldığı tespit edildi ( $\chi^2 = 87,800$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0,000$ ). Gıda katkı maddelerinin kendi aralarında toplam hemosit sayılarına bakıldığında ise SNi'de tespit edilen azalmanın SB ve SNa'ya göre daha fazla olduğu belirlendi.



Şekil 5. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozları zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra, larval toplam hemosit sayılarındaki değişim (x 10<sup>6</sup> hücre/ml)

\* Her çubuk ortalama hücre sayısı (x10<sup>6</sup>) ± standart hatayı temsil eder. Önemli farklılıklar farklı harflerle belirtilmiştir (a-c) (Mann Whitney U testi, P < 0,05).

\*\* Sodyum Benzoat: 9 x 10<sup>-6</sup>; Sodyum Nitrat: 18 x 10<sup>-6</sup>; Sodyum Nitrit: 5 x 10<sup>-6</sup> M

### 3.2. Farklı Hemosit Sayıları ve Mitotik İndeks

*G. mellonella* larvalarında bulunan hemosit tipleri Şekil 6'da gösterilmiştir. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozları ile zorla beslemesi yapılan son dönem larvalarda prohemosit, plazmatosit, granülosit, siferülosit ve oenosit oranlarının kontrol gruplarına göre farklı oldukları istatistiksel olarak belirlendi (Tablo 2). Prohemosit hücre yoğunluğunun SB ve SNa uygulamalarında kontrol gruplarına kıyasla azaldığı, SNi uygulamasında da suyla yapılan kontrole göre azaldığı tespit edildi ( $\chi^2 = 108,514$ ; df = 4; P = 0,000). Plazmatosit hücre sayılarının kontrol grupları arasında ve SB uygulamasında herhangi bir farklılık olmadığı belirlenirken, SNa ve SNi uygulamasında arttığı görülmektedir (F = 17,997; df = 4,220; P = 0,000). Granülasit hücre sayılarında ise kontrol gruplarıyla karşılaştırılan gıda katkı maddelerinin tümünde önemli derecede azalmanın olduğu belirlendi (F = 41,266; df =

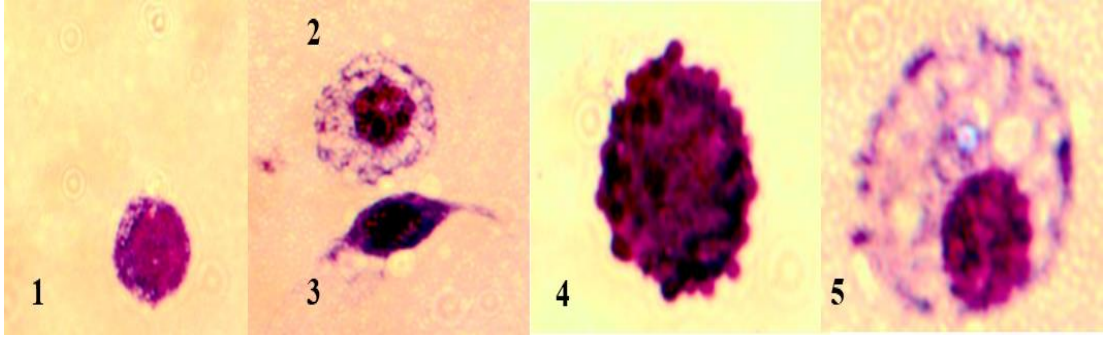
4,220; P = 0,000). Granülosit hücrelerinin aksine gıda katkı maddeleri uygulamasına bağlı olarak siferülosit hücrelerinin artış gösterdiği tespit edildi (F = 71,008; df = 4,220; P = 0,000). Oenositoid hücrelerinde ise SB ve SNa uygulamasına bağlı artış görülürken, SNa uygulamasının herhangi bir değişime neden olmadığı belirlendi ( $\chi^2 = 91,965$ ; df = 4; P = 0,000).

*G. mellonella* larvalarına ait hemositlerde meydana gelen mitoz bölünmeye ait görüntüler Şekil 7’de gösterilmektedir. Ayrıca, SB, SNa ve SNa uygulanan larvalarda mitotik indeks oranlarının kontrol gruplarına kıyasla önemli derecede artış gösterdiği istatistiksel olarak tespit edildi ( $\chi^2 = 173,439$ ; df = 4; P = 0,000) (Tablo 2).

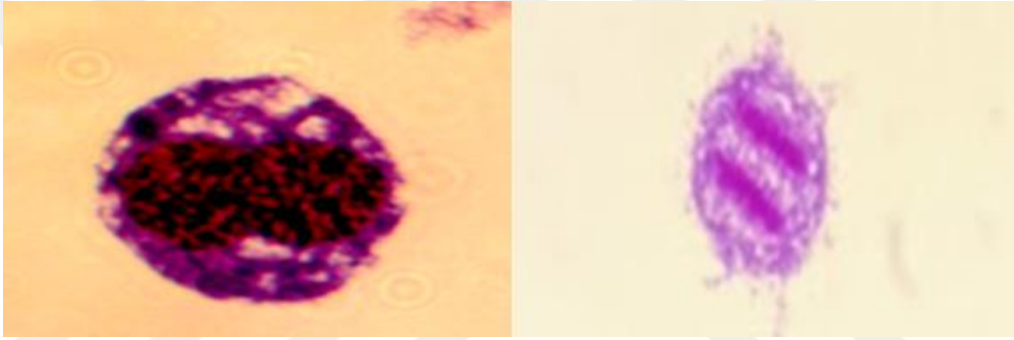
Tablo 2. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozları zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra, larval farklı hemosit tiplerinde ve mitotik indekste görülen yüzdesel (%) değişimler

LD <sub>50</sub> (M)	Farklı Hemosit Sayıları (ORT ± SH %)*					
	Prohemosit	Plazmatosit	Granülosit	Siferülosit	Oenositoid	Mitotik İndeks
Kontrol Su	1,09±0,06 a	47,80±0,32 a	48,00±0,29 a	2,83±0,09 a	0,14±0,03 a	0,09±0,02 a
Kontrol PBS	0,50±0,07 b	48,49±0,30 ac	46,19±0,34 a	3,24±0,13 a	0,38±0,07 b	1,03±0,09 b
Sodyum Benzoat	0,30±0,04 bc	46,69±1,31 a	42,62±1,26 b	7,13±0,35 b	0,28±0,03 b	2,22±0,12 c
Sodyum Nitrat	0,20±0,03 c	57,63±1,44 b	30,47±1,73 c	7,32±0,49 b	0,13±0,03 a	4,04±0,35 d
Sodyum Nitrit	0,74±0,04 d	51,18±1,18 c	35,70±1,13 d	7,58±0,35 b	1,19±0,09 c	2,20±0,10 c

\*Aynı sütunda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır (P ≤ 0,05). ORT (%): Yüzdesel Ortalama; SH: Standart Hata.



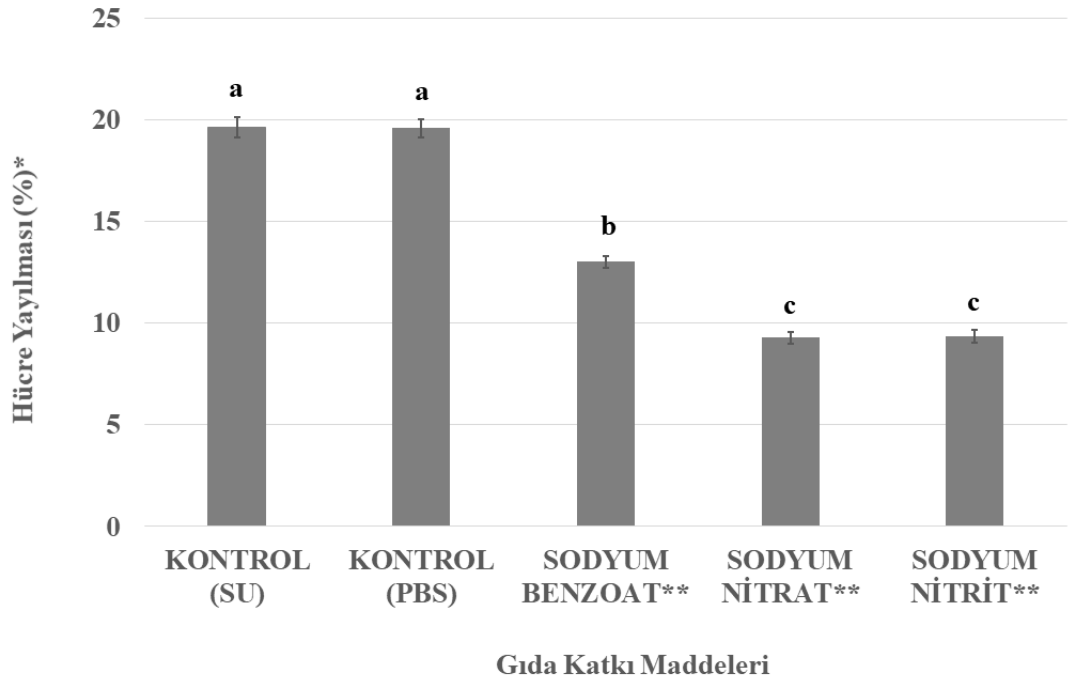
Şekil 6. *G. mellonella* larvalarında hemosit tipleri (1: prohemosit, 2: granülosit, 3: plazmatosit, 4: siferülosit, 5: oenosit). (1000 X Büyütme)



Şekil 7. *G. mellonella* larval hemositlerinde mitoz bölünme (1000 X Büyütme)

### 3.3. Hemosit Yayılması

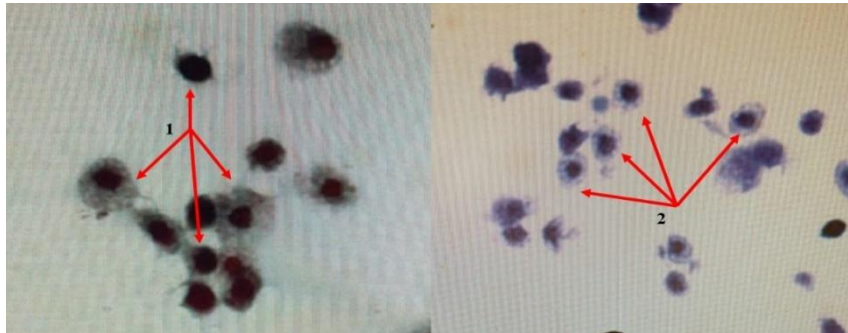
*G. mellonella* larvalarında yayılan hemosit hücrelerine ait görüntüler Şekil 9'da gösterilmiştir. *G. mellonella* larvalarına zorla besleme yöntemiyle uygulanan gıda katkı maddelerinin hemosit hücrelerinin yayılma kabiliyetleri üzerindeki etkileri ise Şekil 8'de gösterilmektedir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan SB, SNa ve SNi uygulamasına bağlı hemositlerde meydana gelen yayılma oranlarının azalmış olduğu belirlendi ( $F = 192,838$ ;  $df = 4,145$ ;  $P = 0,000$ ). Hemosit yayılma oranlarının SB, SNa ve SNi uygulamasında sırasıyla %  $13,03 \pm 0,29$ , %  $9,31 \pm 0,28$  ve %  $9,35 \pm 0,32$  olduğu tespit edildi. SNa ve SNi uygulamasında görülen hücre yayılma kabiliyetlerinin ise kontrol gruplarına kıyasla yaklaşık yarısı kadar olduğu görülmektedir.



Şekil 8. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozlarının zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra larval hemositlerindeki yayılma davranışındaki yüzdesel (%) değişimler

\* Her çubuk yüzdesel ortalama  $\pm$  standart hatayı temsil eder. Önemli farklılıklar farklı harflerle belirtilmiştir (a-c) (LSD,  $P < 0,05$ ).

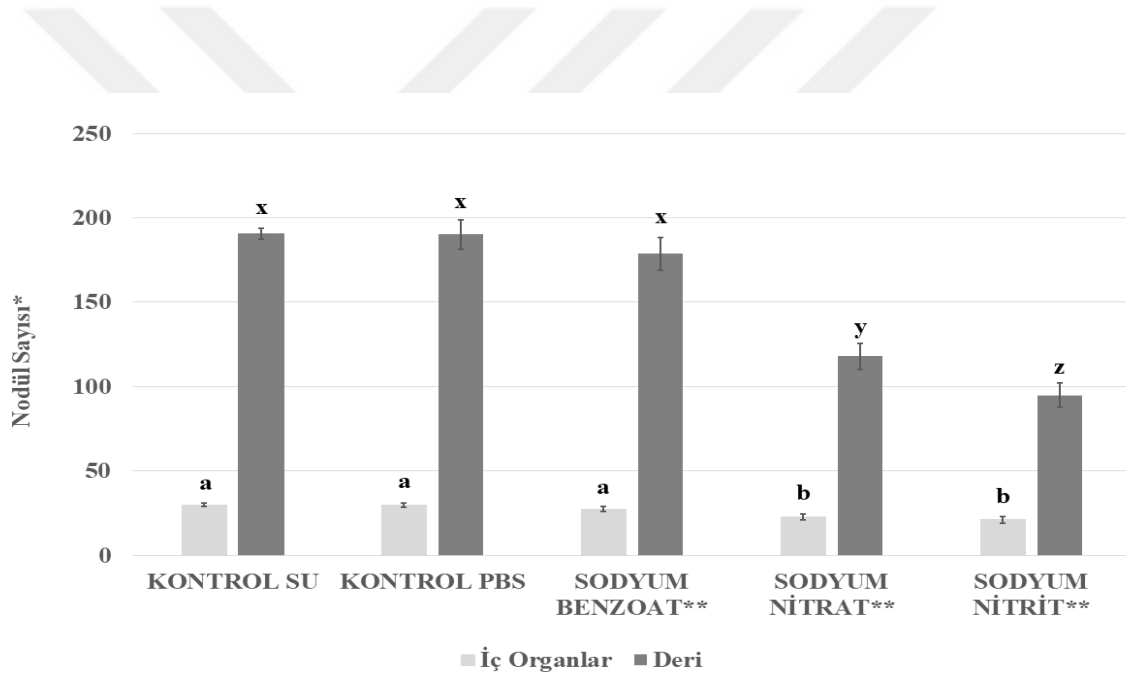
\*\* Sodyum Benzoat:  $9 \times 10^{-6}$ ; Sodyum Nitrat:  $18 \times 10^{-6}$ ; Sodyum Nitrit:  $5 \times 10^{-6}$  M



Şekil 9. *G. mellonella* larval hemolenfindeki yayılış gösteren hemositlerin mikroskopik görüntüleri (1: yayılan granülosit hücreleri, 2: normal granülosit hücreleri). (400 X Büyütme)

### 3.4. Nodülasyon

Laminarin ile indüklenen nodül oluşumu Şekil 11’da görülmektedir. İç organlarda ve deride görülen nodül oluşumunun kontrol grupları arasında farklı olmadığı belirlendi (Şekil 10). Ayrıca, SB uygulamasına bağlı iç organlar ve deri üzerinde oluşan nodül sayılarının kontrol grupları ile aralarında istatistiksel fark olmadığı tespit edildi. SNa ve SNi uygulamasında ise hem iç organlarda hem de deri üzerinde oluşan nodül sayılarının kontrol gruplarına kıyasla azaldığı istatistiksel olarak belirlendi (İç organlar için:  $F = 7,242$ ;  $df = 4,145$ ;  $P = 0,000$ ; Deri için:  $F = 34,311$ ;  $df = 4,145$ ;  $P = 0,000$ ).

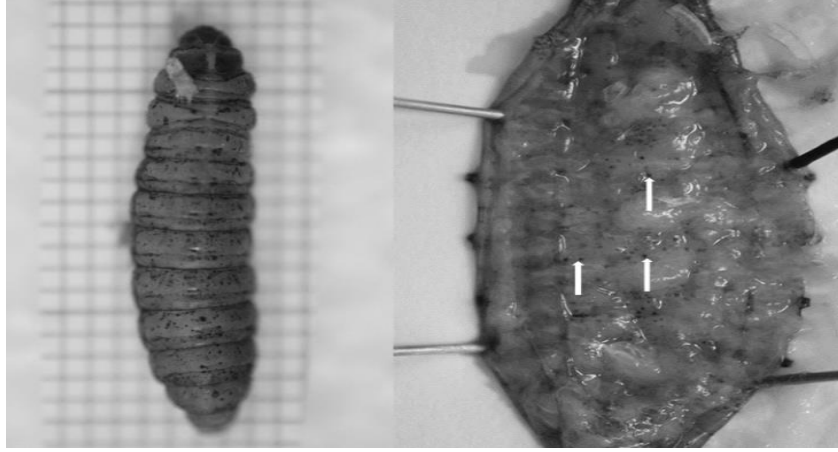


Şekil 10. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozlarının zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra, larval iç organlar ve deri üzerindeki nodül sayılarında görülen değişimler

\* Her çubuk ortalama  $\pm$  standart hatayı temsil eder. Önemli farklılıklar farklı harflerle belirtilmiştir (İç organlar için: a-c; Deri için: x-z) (LSD,  $P < 0,05$ ).

\*\* Sodyum Benzoat:  $9 \times 10^{-6}$ ; Sodyum Nitrat:  $18 \times 10^{-6}$ ; Sodyum Nitrit:  $5 \times 10^{-6}$  M





Şekil 11. *G. mellonella* larvalarında nodül oluşumu (Gwokyalya ve Altuntaş, 2019).

### 3.5. Enkapsülasyon ve Melanizasyon

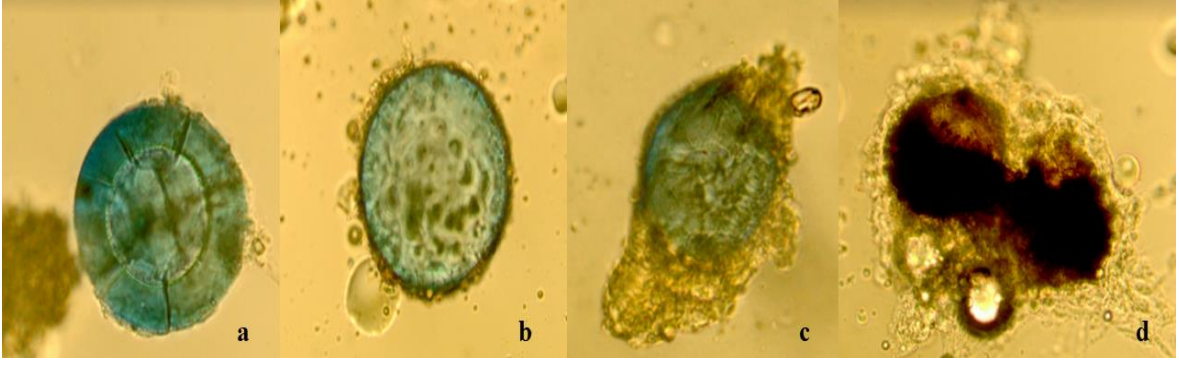
Gıda katkı maddelerinin zorla besleme yöntemiyle uygulanması sonrası elde edilen *in vitro* enkapsülasyon indeksleri Tablo 3'te görülmektedir. Ayrıca gıda katkı maddeleri ile zorla beslenen *G. mellonella* larvalarında 24 saat sonra belirlenen enkapsülasyon durumları Şekil 12'de gösterilmiştir. Enjeksiyondan 4 saat sonra enkapsüle olmamış boncuk oranlarının kontrol gruplarında ortalama % 8 olduğu, gıda katkı maddelerinin uygulanmasında ise kontrol gruplarına kıyasla ortalama 3 katı kadar olduğu belirlendi ( $x^2 = 52,036$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0,000$ ). Benzer bir şekilde enjeksiyondan 24 saat sonra gıda katkı maddelerinde görülen enkapsüle olmamış boncuk oranlarının kontrol gruplarına kıyasla artış gösterdiği tespit edildi ( $x^2 = 19,026$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0,001$ ). Zayıf enkapsülasyon durumlarına bakıldığında, 4 saat sonra oluşan kapsüllerin kontrol gruplarında, SNa ve SNi uygulamalarında ortalama % 70 oranında olduğu belirlenirken, SB uygulamasına bağlı zayıf enkapsülasyon oranında azalmanın olduğu görülmektedir ( $F = 2,933$ ;  $df = 4,145$ ;  $P = 0,023$ ). 24 saat sonra oluşan zayıf enkapsülasyon oranlarında ise uygulanan gıda katkı maddelerinin tümünde kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede artış olduğu tespit edildi ( $x^2 = 83,388$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0,000$ ). Ancak, güçlü enkapsülasyon oranlarının hem 4. saatte hem de 24. saatte SB, SNa ve SNi uygulamalarında kontrol gruplarına kıyasla azaldığı

istatistiksel olarak belirlendi (4. saat için:  $x^2 = 79,959$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0,000$ ; 24. saat için:  $x^2 = 76,401$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0,000$ ).

Tablo 3. 24 saat süresince gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozlarına zorla besleme yöntemi ile maruz kalan larvalara uygulanan boncuk enjeksiyonundan 4. ve 24. saat sonrasında hemositlerde belirlenen enkapsülasyon oranlarındaki yüzdesel (%) değişimler

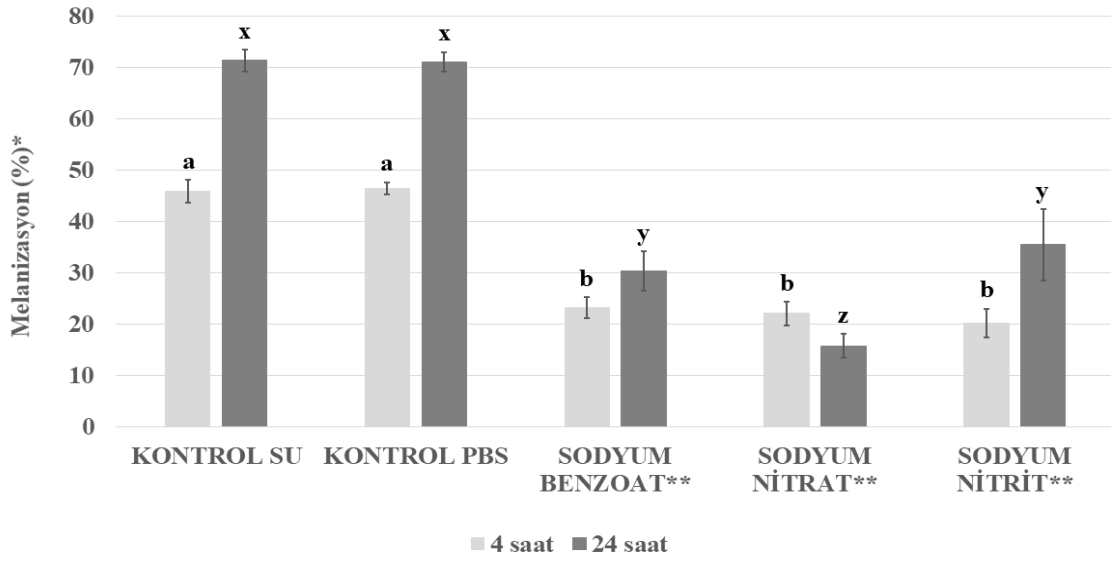
Enkapsülasyon Durumu (ORT ± SH %)*						
LD <sub>50</sub> (M)	Enkapsüle Olmamış		Zayıf		Güçlü	
	4 saat	24 saat	4 saat	24 saat	4 saat	24 saat
Kontrol Su	8,00 ± 1,37 a	4,34 ± 0,92 x	72,52 ± 1,92 a	12,98 ± 1,19 x	19,50 ± 1,50 a	82,68 ± 1,23 x
Kontrol PBS	7,87 ± 1,12 a	4,27 ± 0,80 x	72,28 ± 1,35 a	12,53 ± 1,21 x	19,70 ± 1,01 a	83,20 ± 1,56 x
Sodyum Benzoat	25,51 ± 3,33 a	10,47 ± 2,18 xy	60,09 ± 2,94 b	47,14 ± 3,54 y	14,40 ± 1,50 b	42,40 ± 4,57 y
Sodyum Nitrat	24,63 ± 1,67 b	11,80 ± 1,67 y	71,70 ± 1,73 a	50,00 ± 3,04 y	3,08 ± 1,23 c	38,20 ± 3,61 y
Sodyum Nitrit	29,02 ± 4,46 b	17,19 ± 3,44 y	68,01 ± 4,27 a	46,27 ± 4,50 y	2,97 ± 1,40 c	36,54 ± 6,62 y

\*Aynı sütunda farklı harfle (4 saat için: a-c; 24 saat için: x-y) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $P \leq 0,05$ ). ORT (%): Yüzdesel Ortalama; SH: Standart Hata.



Şekil 12. Gıda katkı maddeleri ile zorla beslenen *G. mellonella* larvalarında 24 saat sonra belirlenen enkapsülasyon durumları (a: enkapsüle olmamış, b: zayıf enkapsüle olmuş, c: güçlü enkapsüle olmuş) ve melanizasyon (d), 100 X büyütme

Gıda katkı maddelerinin uygulanmasına bağlı olarak boncuklarda meydana gelen melanizasyon oranlarındaki değişimler ise Şekil 13'te verilmektedir. Enjeksiyondan 4 saat sonra SB, SNa ve SNi uygulamasında melanize olan boncuk oranlarının kontrol gruplarına kıyasla önemli derecede azaldığı belirlendi ( $F = 27,375$ ;  $df = 4,145$ ;  $P = 0,000$ ). Bu verilere benzer olarak 24. saatte SB, SNa ve SNi uygulamasına bağlı melanizasyon oranlarının da kontrol gruplarına kıyasla azaldığı istatistiksel olarak tespit edildi ( $F = 27,982$ ;  $df = 4,145$ ;  $P = 0,000$ ).



Şekil 13. 24 saat süresince gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozlarına zorla besleme yöntemi ile maruz kalan larvalara uygulanan boncuk enjeksiyonundan 4. ve 24. saat sonrasında melanizasyon oranlarındaki yüzdesel (%) değişimler

\* Her çubuk yüzdesel ortalama ± standart hatayı temsil eder. Önemli farklılıklar farklı harflerle belirtilmiştir (4 saat: a-c; 24 saat için: x-z) (LSD, P < 0,05).

\*\*Sodyum Benzoat: 0,45 M; Sodyum Nitrat: 0,81 M; Sodyum Nitrit: 0,29 M

### 3.6. Hücre Ölümü (Apoptoz/Nekroz)

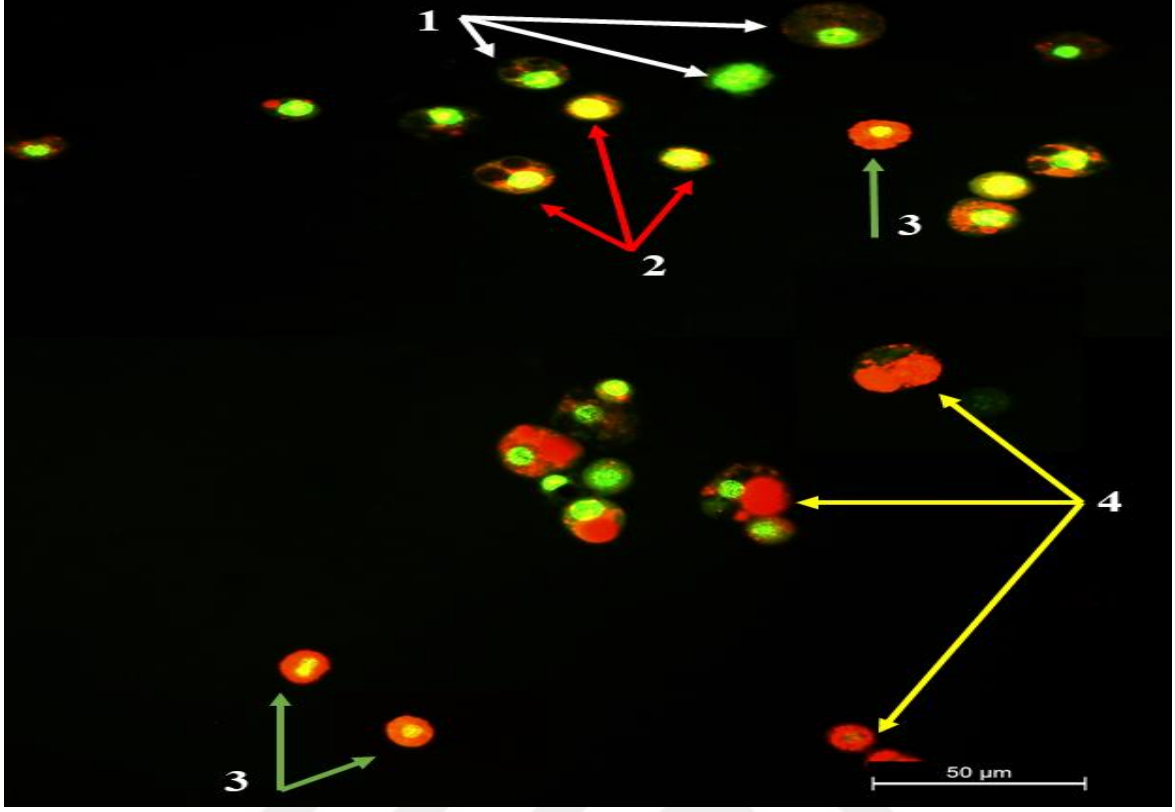
Gıda katkı maddeleri ile muamale gören *G. mellonella*'nın larval hemositlerinde görülen apoptotik ve nekrotik ölüm durumlarının mikroskopik incelemesi sonrasında elde edilen veriler ile meydana gelen değişimler Tablo 4 ve Şekil 14'te verilmektedir. SB, SNa ve SNi uygulamasına bağlı hemositlerde görülen canlı hücre oranlarının kontrol gruplarına kıyasla azaldığı (F = 115,250; df = 4,145; P = 0,000), bunun aksine erken apoptotik hücre oranlarında kontrol gruplarına kıyasla artış gösterdiği istatistiksel olarak tespit edildi (F = 83,117; df = 4,145; P = 0,000). Geç apoptotik hemosit oranlarında ise gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozlarına maruz kalan larvalarda kontrol gruplarına kıyasla artış olduğu tespit edildi (F = 54,050; df = 4,145; P = 0,000). Aynı zamanda nekrotik hücre oranlarının

SB uygulamasında değişmediği, SNa uygulamasında azaldığı ve SNi uygulamasına bağlı artış gösterdiği tespit edildi ( $\chi^2 = 61,118$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0,000$ ).

Tablo 4. Gıda katkı maddelerinin LD<sub>50</sub> dozları zorla besleme yöntemi ile larvalara uygulandıktan 24 saat sonra larval hemositlerdeki canlılık, apoptotik ve nekrotik durumların yüzdesel değişimi

LD <sub>50</sub> (M)	Apoptoz ve Nekroz (ORT $\pm$ SH %)*			
	Canlı Hücre	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz
Kontrol Su	91,79 $\pm$ 0,17 a	5,84 $\pm$ 0,14 a	2,00 $\pm$ 0,12 a	0,37 $\pm$ 0,06 a
Kontrol PBS	91,74 $\pm$ 0,29 a	5,82 $\pm$ 0,22 a	2,08 $\pm$ 0,11 ac	0,36 $\pm$ 0,07 a
Sodyum Benzoat	87,60 $\pm$ 0,50 b	9,03 $\pm$ 0,39 b	2,99 $\pm$ 0,23 b	0,39 $\pm$ 0,09 a
Sodyum Nitrat	87,40 $\pm$ 0,61 b	9,87 $\pm$ 0,52 b	2,60 $\pm$ 0,20 bc	0,14 $\pm$ 0,03 b
Sodyum Nitrit	77,67 $\pm$ 0,90 c	14,46 $\pm$ 0,58 c	6,30 $\pm$ 0,37 d	1,60 $\pm$ 0,16 c

\*Aynı sütunda farklı harfle (a-c) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $P \leq 0,05$ ). ORT (%): Yüzdesel Ortalama; SH: Standart Hata.



Şekil 14. *G. mellonella* hemositlerinde apoptoz ve nekroz 1) canlı hücreler 2) erken apoptoz hücreleri 3) geç apoptoz hücreleri 4) nekrotik hücreler

#### 4. TARTIŞMA

Yeni terapötik maddeler ile gıda katkı maddelerinin *in vivo* toksisite çalışmalarında genellikle omurgalı türlerine ait model organizmalar kullanılmaktadır (Wojda, 2017). Kemirgen modellerinin kullanılması ile yapılan analizlerde insanlarda ortaya çıkabilecek yan etkilerin % 50'sinin tahmin edildiği bildirilmiştir (Hunt, 2017). Bununla birlikte memeli modellerinin kullanılması etik kabul konuları ve yüksek maliyetler ile ilgili konuları gündeme getirmektedir (Browne ve Kavanagh, 2013). Bu nedenle *in vivo* toksisite çalışmalarında memeli model organizmaların yerine alternatif olarak kullanılacak modellerin araştırılması önemli bir husustur.

Böcek ve memeli türlerinde gastrointestinal sistemde yer alan dokuların anatomik ve fizyolojik fonksiyonlarının benzerlikleri (Mukerjee vd., 2013), detoksifikasyon mekanizmalarında rol oynayan faz I ve faz II enzimlerinin yüksek oranda korunmuş olması (Feyereisen, 1999; Montella vd., 2012), böceklerin alternatif model organizma olarak kullanılmasını güçlendirmektedir. Böcek ve memeli sınıflarının milyonlarca yıl önce taksonomik olarak birbirinden ayrılmalarına rağmen doğuştan gelen bağışıklık sistemlerinin benzerlik gösterdiği de bilinmektedir (Kavanagh ve Reeves, 2004). Böcek hemosit ve memeli nötrofil hücrelerinin patojenlere karşı fagositoz ve litik enzimlerin salgılanması olarak bilinen degranülasyon reaksiyonlarında benzerlik gösterdikleri bildirilmiştir (Renwick vd., 2007). Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda çeşitli toksinlere maruz kalan memeli nötrofillerinin ve böcek hemositlerinin inhibe edildiği gösterilmiştir (Renwick vd., 2007; Fallon vd., 2010; Banville vd., 2011). Böceklerde hem humoral hem de hücrel yollardan oluşan doğuştan gelen bağışıklık sistemi yer almaktadır. Humoral bağışıklık sisteminde kompleks enzimler ve bazı antimikrobiyal peptitler rol almaktadır (Miller vd., 1993; Canyurt, 1994). Hücrel bağışıklık ise dolaşımdaki hemositler tarafından kapsülleme, nodülasyon, melanizasyon ve fagositoz gibi yanıtlar ile gerçekleştirilir. Bununla birlikte dolaşımda yer alan hemositler patojenlerin tanınmasında, bağışıklıkla ilgili protein, peptid, reaktif oksijen ve azot türlerinin sentezinde de rol oynamaktadır (Strand, 2008; Altuntaş vd., 2012; Mizerska-Dudka ve Andrejko, 2012). Bu nedenle böcek savunmasına doğrudan ve hemen katılımları nedeniyle hemositler çeşitli kimyasalların toksisitenin belirlenmesinde iyi bir fizyolojik göstergedir. Araştırmacılar hücrel bağışıklık yanıtlarını biyo-gösterge olarak kullanarak çeşitli kimyasalların ve ksenobiyotiklerin etkilerini bildirmişlerdir (Pech ve

Strand, 2000; Lavine ve Strand, 2002; Altuntaş vd., 2012; Salem vd., 2014; Er vd., 2017, Maguire vd., 2017; Gwokyalıya ve Altuntaş, 2019; Yücel ve Kayış, 2019). Bu çalışma kapsamında da yukarıda bahsedilen nedenler göz önünde bulundurularak test edilen gıda koruyucu maddelerin immünotoksik etkileri model organizma olan *G. mellonella* larvalarının hemositleri ile tespit edilmiştir. Toksik maddelerin detoksifikasyonu sırasında meydana gelen immün tepkimelerde böcek hemolenfide sirküle edilen toplam hemosit sayılarında (THC, Total Hemocyte Counts) değişiklik olduğu bilinmektedir (Kurihara vd., 1992). Gıda koruyucu maddeler arasında yer alan SB, SNa ve SNi' nin ise *G. mellonella*'nın larval hemolenfide belirlenen toplam hemosit sayısında azalmaya neden olduğu belirlendi. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara benzer olarak çeşitli kimyasal maddelerin ve bazı insektisitlerin böceklerde THC'de azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Kurt ve Kayış, 2015; Er vd., 2017; Coates vd., 2018; Gwokyalıya ve Altuntaş, 2019; Yücel ve Kayış, 2019). THC'de meydana gelen bu azalma immünolojik yanıtta (Pandey vd., 2007), larvadaki hematopoietik fonksiyonun inhibisyonundan (Zhu vd., 2012) ve azalmış mitotik aktiviteden (Rajak vd., 2015) kaynaklanabilmektedir. Ayrıca SNi ile zorla beslenen larvalarda meydana gelen azalmanın SB ve SNa'ya göre daha fazla olduğu elde edilen verilerde görülmektedir. Bu durum SNi ile zorla beslenen larvalarda ortaya çıkan toksitenin, SB ve SNa'ya göre daha fazla olduğuna işaret etmektedir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda böcek hemolenfide sirküle edilen hemosit sayısının mitotik aktivite ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gardiner ve Strand, 2000). Ancak, SB, SNa ve SNi ile zorla beslenen larvalarda THC'de gözlenen azalmaya rağmen, mitotik hemosit oranının arttığı tespit edildi. Bu durum gıda katkı maddelerinin mitoz bölünmeyi indüklediğini ancak devam eden sitotoksitenin hücre ölüm yollarını da teşvik edebileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle gıda koruyucu maddeler ile zorla beslenen larvaların hemolenfinden izole edilen hemositlerde apoptotik indeksin arttığı belirlendi. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara benzer bir çalışmada da doğal insektisit olarak bilinen borik asit ile zorla beslenen *G. mellonella* larvalarında doz artışına bağlı olarak THC ile canlı hücre sayılarında azalmanın olduğu, apoptotik ve nekrotik hücre ölüm oranlarında ise artış meydana geldiği bildirilmiştir (Gwokyalıya ve Altuntaş, 2019). Bu veriler birlikte düşünüldüğünde gıda koruyucu maddeler, çeşitli ksenobiyotikler gibi model organizmanın larval hemolenfide hücre canlılığını azaltarak toplam hücre sayısının değişmesine neden olmaktadır. Ayrıca, hücre ölüm yollarının (apoptoz ve nekroz), enfeksiyon sonrası yardıma, patojen veya ksenobiyotik eliminasyonuna (Lavine ve Strand, 2002; Altuntaş vd., 2012; Wu vd., 2015;



Coates vd., 2018) ve ayrıca immünoyarışmacı hücrelerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olduğu iyi bilinmektedir (Cho ve Kim, 2004). Bu nedenle SB, SNa ve SNi'ye maruz kalan larvalarda apoptotik reaksiyonlar tetiklenerek immünotoksisitenin giderilmeye çalışıldığı düşünülmektedir. Hücre ölüm mekanizmaları arasında yer alan nekroz oranlarına bakıldığında ise SNi ile zorla beslenen larvalarda nekrozun daha fazla olduğu görülmektedir. Bu SNi kaynaklı sitotoksisite durumu, model organizma *G. mellonella* larvalarında lipid peroksidasyonunun artması ile ilişkili olabilir. Çünkü lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen türlerinin düzeylerinde de artışa yol açarak hücre zarlarının bozulmasına, hücre hasarına ve devamında hücrenin nekroz gibi patolojik ölümüne neden olmaktadır (Banakou ve Dailianis, 2010; James ve Xu, 2011). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda SB, SNa ve SNi'nin detoksifikasyon sistemi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Bano vd., 2014; Gaur vd., 2018; Khodaei vd., 2019; Radwan, 2020; Radwan vd., 2020). SB'ye maruz kalan zebra balığında gelişimsel bozukluklar ve anksiyete benzeri davranışlarla birlikte oksidatif stresin meydana geldiği görülmüştür (Gaur vd., 2018). Bir başka çalışmada ise SB ve SNi karışımı ile tedavi edilen ratların böbreklerinde SOD ve CAT enzim aktiviteleri ile GSH miktarının azaldığı, MDA miktarında ise artış olduğu gösterilmiştir (Radwan, 2020). Benzer bir çalışmada ise erkek sıçanlara uygulanan SB, SNi ve bu maddelerin karışımı antioksidan kimyasallarda (SOD, CAT, GSH) azalmaya, MDA miktarında ise artışa neden olmaktadır (Radwan vd., 2020). Ayrıca SB'nin insan nötrofil hücrelerinde oksidatif solunum patlaması ve fagositoz üzerinde önemli etkilerinin olduğu (Bano vd., 2014), farelerin böbrek dokularında lipid peroksidasyonu ile GSH içeriğini artırdığı ve CAT aktivitesini önemli ölçüde azalttığı da bildirilmiştir (Khodaei vd., 2019). Böcek hemositlerinin serbest reaktif oksijen türlerini ürettiği, aynı zamanda detoksifikasyonda rol aldıkları bilinmektedir (Slepneva vd., 1999; Glupov vd., 2001; Parakash, 2008). Yapılan bir çalışmada insektisit olan imidacloprid'in *G. mellonella* larvalarında doza bağlı olarak SOD ve CAT enzimleri ile MDA seviyelerinde artışa ve THC'de azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Yücel ve Kayış, 2019). Tüm bu çalışmalar ve elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde, SB, SNa ve SNi ile zorla beslenen *G. mellonella* larvalarında THC'de görülen azalmanın oksidatif stres kaynaklı immünotoksisite ile ilişkili olabileceği, aynı zamanda immün savunmada rol oynayan ve hasar gören hücrelerin fizyolojik çevreye zarar vermeden apoptoz ile uzaklaştırılmaya çalışıldığı düşünülmektedir.

Gıda koruyucu maddeler ile zorla besleme yapılan *G. mellonella* larvalarının dolaşımında yer alan prohemosit, plazmatosit, granülosit, sperulosit ve oenosit hücre

tiplerinin sayılarında meydana gelen değişimler ile bu maddelerin hücrenel bağışıklık reaksiyonları üzerindeki etkileri bu çalışma kapsamında anlaşılmaya çalışılmıştır. SB, SNa ve SNi ile zorla beslenen larvalarda prohemosit ve granülosit hücre sayılarının azaldığı, plazmatosit, sperulosit ve oenosit hücre sayılarının ise arttığı görülmektedir. Prohemositler kök hücre özelliğinde ve farklı hemosit tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir (Strand, 2008). Bu nedenle gıda koruyucu madde uygulanan larvalarda prohemosit sayılarındaki azalma, detoksifikasyon reaksiyonlarında rol oynayacak önemli hemositler olan plazmatosit, siferülosit ve oenosit hücre tiplerine farklılaşmasından kaynaklanabilir. Ayrıca yapılan bir çalışmada borik asit ile zorla beslenen *G. mellonella* larvalarında artan konsantrasyona bağlı olarak azalan prohemositlerin otofaji ve/veya hücre ölümü nedeniyle olduğu bildirilmiştir (Gwokyalya ve Altuntaş, 2019). Bu nedenle azalan prohemosit sayıları apoptotik ve nekrotik hücre ölüm oranlarının da artmasıyla bağlantılı olarak, gıda koruyucu maddelerin sitotoksitesinin nedenlerini desteklemektedir. SB, SNa ve SNi ile zorla beslenen larvalarda plazmatosit hücrelerinde artış görülürken, granülosit hücrelerindeki azalmanın nedeni, önemli hücrenel bağışıklık yanıtı olan fagositoz ve enkapsülasyon tepkilerindeki azalma ile ilişkili olabilir. Çünkü *G. mellonella*'da granüler hücrelerin diğer hemosit türlerinden daha güçlü bir fagositik yeteneğe sahip olduğu bilinmektedir (Strand, 2008; Wu vd., 2016). Ayrıca fagositoz olaylarında rol alan plazmatosit ve granülosit hücre yüzeylerinde bulunan reseptörlerin memeli fagositlerindeki reseptörlere benzediği bilinmektedir (Vilmos ve Kurucz, 1998). Bu nedenle gıda koruyucu maddelerin memeli fagosit hücrelerinde ve fagositoz yeteneğinde azalmaya neden olabileceği düşünölmektedir. İnsan nötrofil hücrelerinin bakteri ve mantar hücrelerini fagosite etme ve öldürme mekanizmalarının böcek hemositlerinde de benzer mekanizma ile gerçekleştiği görölmektedir (Bergin vd., 2005). Özellikle nötrofil hücrelerinde süperoksit üretiminde gerekli olan anahtar proteinlerin hemosit lizatlarında da belirlendiği ve bu proteinlerin immünolojik reaksiyonlar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bergin vd., 2005). Bununla birlikte yabancı materyallerin hemositler tarafından fagosite edilmesinde, NADPH oksidaz aktivitesini içeren solunum patlaması yolunu uyardığı ve süperoksit üretiminin hem nötrofiller hem de hemositler tarafından etkili mikrobiyal öldürme için gerekli olduğu gösterilmiştir (Reeves vd., 2002; Bergin vd., 2005). Daha önce yapılan bir çalışmada ise gıda koruyucu maddeler arasında yer alan potasyum nitrat ile tedavi edilen *G. mellonella* larvalarının hemolenfinden SOD enzim aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir (Maguire vd., 2017). Bu nedenle *G. mellonella* larvalarına uygulanan gıda koruyucu maddeleri, nötrofillerde olduğu gibi granülositlerde de artan

süperoksit anyonlarının solunum patlamasına ve granülositlerin degranüle olmasına neden olabilir. Böylece gıda koruyucu maddelere karşı oluşturulacak immün cevabın plazmatositler ile gerçekleştirilmeye çalışıldığı düşünülmektedir. Dolaşımda bulunan plazmatositlerin daha sonra granülositlere, siferülositlere ve önositoidlere farklılaştığı bildirilmiştir (Beaulaton, 1979; Nakahara vd., 2010). Bu nedenle plazmatositlerde görülen artış siferülosit ve önosit hücrelerinde görülen artış ile ilişki olabilir. Siferülosit sayılarında görülen artışın başka bir nedeni ise böceğin kütiküler yapısının madde maruziyeti ile etkilenmesiyle ilişkili olabilir. Çünkü siferülositler, kütiküler bileşenlerin taşınmasına yardımcı olmaktadır. Böylece madde maruziyetine bağlı artan kutiküler hasarı önlemek ve/veya baskılamak için artan siferülosit oranı önemli bir immün yanıt olarak değerlendirilebilir (Gwokyalaya ve Altuntaş, 2019). Gıda koruyucu maddeleri ile zorla beslenen larvalarda önositoid sayılarında görülen değişimlere bakıldığında ise SB ve SNI ile zorla beslemeye bağlı olarak meydana gelen artışın, plazmatosit sayılarındaki artış ve melanizasyon tepkisi ile ilişkisi olabilir. Çünkü önositoidler humoral ve hücrel bağışıklık tepkimelerinde rol oynayan melanizasyon reaksiyonlarında görev alan fenolksidaz enziminin öncüllerini sentezlemektedir (Beerntsen vd., 2000; Lavine ve Strand, 2002). Diğer yandan SNa ile zorla beslenen larvalarda önositoid hücrelerinde istatistiksel bir değişim yoktur. Bu durumla ilişkili olarak SNa uygulanan larvaların hemolenfinde, diğer gruplara göre en düşük melanizasyon oranının olduğu belirlenmiştir. Böylece gıda koruyucu maddelerinin farklı hemosit tipleri üzerinde farklı etkiler göstermelerinin, bu hemositlerin rol oynadığı savunma reaksiyonlardaki değişikliklerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalarda gıda koruyucu maddelerin larval hemolenfteki fenolksidaz aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması önerilmektedir.

Hücrel bağışıklık tepkimeleri olan fagositoz, enkapsülasyon ve nodülasyon reaksiyonları sırasında görülen hemosit yayılması, yabancı maddelere hemositlerin (granülositler ve plazmatositler) yapışmasını sağlamak için ortaya çıkmaktadır. *G. mellonella* larvalarında hemositlerin yayılma kabiliyetinin azaltılmasıyla, hemositlere ait hücre iskeletinin yeniden düzenleneceği bildirilmiştir (Mizerska-Dudka ve Andrejko, 2012). Bu yüzden, hemosit aktivitesini inhibe eden çeşitli bileşiklerin *in vivo* testlerinde sitoiskeletal değişiklikler nedeniyle hemosit dağılımının azaldığı bilinmektedir (Vilcinskas vd., 1997; Amiri-Besheli vd., 2000). Plazmatosit-spreading peptid dahil hemositlerin yapışmasını ve yayılmasını düzenleyen çeşitli proteinlerin profillerinin değiştirilmesi de hemositlerde hücre yayılma aktivitesini etkileyebilir (Nakahara vd., 2003). Bununla birlikte

granüler hücrelerin çok sayıda yalancı ayak oluşturma kabiliyetine sahip olması, bu hücrelerin güçlü fagositik yeteneği ortaya çıkardığını göstermektedir (Pendland ve Boucias, 1996). Bu yüzden SB, SNa ve SNi'ye maruz kalan larval hemolenfte granülosit oranında görülen azalma ile hücre yayılma oranlarındaki azalma birbiriyle ilişkili bir fizyolojik durumdur. Böylece elde ettiğimiz veriler, SB, SNa ve SNi'nin *G. mellonella* larva hemositlerinin sitoskelet düzenleme kaskadlarını etkilediği ve bu düzenlemede ilişkili protein profillerini değiştirerek immün hücrelerin yayılma kabiliyetini düşürdüğüne işaret etmektedir.

Nodülasyon, melanizasyon ve kapsülleme reaksiyonları böceklerdeki en önemli hücresel immün reaksiyonlardır. Hemositlerin patojene bağlanması, granülosit degranülasyonuna bağlı mikroorganizma aglütinasyonu, plazmatosit artışı, hemosit yayılımı ve devamındaki kapsül veya nodül oluşumu bu hücresel tepkilerde rol oynayan önemli reaksiyonlardır (Dean vd., 2004). Tüm bu süreçler hem humoral hem de hücresel immün yollar tarafından kontrol edilmektedir. Enkapsülasyon ve nodülasyon sonucunda, patojenlerin etrafı hemositler ile tabakalar halinde kaplanarak, bu tabakaların kısmi ya da komple melanize olmasıyla patojenin öldürülmesi gerçekleşmektedir (Rowley ve Ratcliffe, 1981; Richards ve Edwards, 2002). Ayrıca, yaralanma ya da vücut boşluğuna giren yabancı maddelere karşı savunma tepkimesi olarak fenoloksidaz aktivitesi aracılığıyla da melanizasyon ortaya çıkmaktadır (Nappi, 2000). SB, SNa ve SNi ile zorla beslenen larvalarda, boncuk enjeksiyonundan 4 saat sonra, yani erken evrede, enkapsülasyon oranlarında azalmanın olduğu görülmektedir. Geç evre (24. saat) enkapsülasyon oranlarına bakıldığında ise zayıf enkapsülasyon oranlarında artış, güçlü enkapsülasyon oranlarında ise azalmanın olduğu görülmektedir. Enkapsülasyona uğrayan Sephadex boncuklarda SB, SNa ve SNi uygulamasına bağlı olarak erken ve geç evrede melanizasyon oranlarında ise azalmanın olduğu belirlendi. Ayrıca çalışmada laminarin enjeksiyonu ile SB, SNa ve SNi ile zorla beslenen larvaların iç organlarında ve vücut yüzeyinde meydana gelen nodüllerin oranındaki değişimlerde analiz edilmiştir. SNa ve SNi uygulamasına bağlı olarak nodül sayılarının hem iç organlarda hem de vücut dışında azaldığı belirlenmiştir. Tüm bu veriler gıda koruyucu maddeler ile zorla beslenen larvalarda nodülasyon ve enkapsülasyon tepkilerinin zayıfladığını göstermektedir. Bu durum uygulanan gıda koruyucu maddelerinin hem hemositler üzerindeki sitotoksitesi hem de antioksidan sitem üzerindeki toksisitesi ile ilişkilidir. Böceklerde melanizasyon ve kapsül oluşum mekanizmalarının antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler ile baskılanabileceği (Li vd., 1994; Kumar vd.,

2003; Büyükgüzel ve Büyükgüzel, 2013, Gwokyalıya ve Altuntaş, 2019) ve toksik maddelerin detoksifikasyonu sırasında THC’de azalmanın olabileceği bildirilmiştir (Kurihara vd., 1992; Yücel ve Kayış, 2019). Böylece toplam ve farklı hemosit oranlarında meydana gelen değişimler hemosit aracılı immün yanıtlar olan enkapsülasyon, nodülasyon ve melanizasyon reaksiyonlarını etkilemektedir. Özellikle granülositlerde meydana gelen azalma kapsül oluşumunu ve melanizasyonu baskılamış olabilir (Wu vd., 2016). Ancak plazmosit ve önositoit hücrelerinde meydana gelen artışın aksine kapsül ve melanizasyonda görülen azalma, bu hücrelerde bulunan diğer maddeler tarafından fenoloksidaz aktivitesinin bastırılmasıyla ilişkili olabilir. Çünkü fenoloksidaz aktivitesinin, peptidler ve lizozim gibi diğer endojen faktörlerle değiştiği bildirilmiştir (Zdybicka-Barabas vd., 2014). Bununla birlikte dolaşımdaki hemositlerin yayılma kabiliyetlerinin azalması da daha az hemositin kapsülleme ve nodülasyon hedeflerine bağlanabileceği anlamına gelmektedir. Bu bilgiler ışığında *G. mellonella* larvalarına uygulanan gıda koruyucu maddelerden SB, SNa ve SNi’nin model böceğin hücresel bağışıklık sistemini baskılayarak immunotoksik etkilere neden olduğu düşünülmektedir.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada gıda katkı maddeleri arasında yer alan SB, SNa ve SNi'nin LD<sub>50</sub> değerleri son evre *G. mellonella* larvalarına zorla besleme yöntemi ile uygulanmış, ardından larvalara ait hemositler aracılığıyla ortaya çıkan immün tepkimeler araştırılmıştır. Bu amaçla çalışma kapsamında larvalardaki toplam ve farklı hemosit sayıları, hemositlerin yapışma kabiliyeti, hemosit ölümü (apoptoz-nekroz), mitotik indeks, nodulasyon ve enkapsülasyon-melanizasyon mekanizmaları incelenmiştir.

Bu çalışma sonunda ulaşılan sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Gıda koruyucu maddeler arasında yer alan SB, SNa ve SNi'nin immün sistem üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde *G. mellonella* larvalarının model organizma olarak kullanılabilmesini göstermektedir.

2. Gıda koruyucu maddelerin immün sistem üzerindeki etkilerinin araştırılmasında *G. mellonella* larvalarının tek başına yeterli bir model olmadığı, ancak çok güçlü bir ön model olarak *G. mellonella* larvaları tarafından sağlanan verilerin biyolojik toksisite testlerindeki memeliler ve nörolojik olarak daha gelişmiş omurgalıların sayısını azaltmakta faydalı olacağı düşünülmektedir.

3. Bununla birlikte gıda koruyucu maddeler ile yapılan çalışmalarda *G. mellonella* larvaların gelecekteki potansiyel uygulamalarını da ortaya koymaktadır.

4. Ayrıca ilaç olarak önerilen yeni maddelerin, gıda katkı maddelerinin ve günlük yaşantımızda sıklıkla kullandığımız kimyasal maddelerin memelilerin sitotoksisite testlerinde ve bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerinin araştırılmasında *G. mellonella* larvalarının alternatif model organizma olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

5. *G. mellonella* larvalarına kolay ulaşılabilir olması, maliyet ve etik sorunlarının yaşanmaması, yaşamsal faaliyetlerinin gerçekleştirdikleri şartların memelilere benzer olması da bu türün model olarak kullanılmasını daha da önemli hale getirmektedir. Böylece böcekler ve memeli türleri arasında fizyolojik benzerlik gösteren sistemler, detoksifikasyon mekanizmaları ve doğuştan gelen bağışıklık sistemleri böceklerin alternatif olarak kullanılmasını sağlamaktadır.

## 6. ÖNERİLER

İnsan nüfusunun artışına paralel olarak ortaya çıkan beslenme sorunları gıdaların daha güvenli olacak şekilde insanlara ulaştırılmasını gerektirmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan yöntemler arasında gıdaların katkı maddeleri ile korunması yer almaktadır. Bu katkı maddelerinin de gıdaları korumasıyla birlikte sürekli tüketimde ya da belli dozların üzerinde vücuda alınması halinde insan sağlığına olumsuz etkileri olabilmektedir. Bu nedenle kullanılmakta olan ve yeni önerilen gıda katkı maddelerinin günlük alınabilir değerlerinin, toksisite ve genotoksisite gibi reçete bilgilerinin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla omurgasız modellerin kullanılmasının da avantajları bulunmaktadır.

Bu çalışmada model olarak kullanılan *G. mellonella* larvalarının immün sistem üzerinde SB, SNa ve SNI'nin etkileri belirlenmiştir. Hemositler aracılığıyla gerçekleştirilen doğal bağışıklık etkilerinin belirlenmesinde ortaya çıkan değişimlerin, moleküler temelli çalışmalarla hemositler ile immün reaksiyonlar arasındaki ilişkilerin daha fazla aydınlatılacağı düşünülmektedir. Ayrıca immün sistem etkileri ve maddelerin detoksifikasyon mekanizmaları arasındaki ilişkinin kurulması amacıyla bu maddelerin *G. mellonella* larvalarında antioksidan enzim değişiklikleri ile lipid peroksidasyon seviyelerinin de araştırılması gerekmektedir. Aynı zamanda, bu maddelerin *G. mellonella* larvalarının sinir sistemi üzerindeki etkilerini ve fenoloksidaz kaskad etki mekanizmasını belirleyebilmek için daha detaylı çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Bununla birlikte model olarak kullanılan *G. mellonella* larvalarının arı kovanlarında zararlı bir tür olması ve SB, SNa ve SNI'nin ise immün sistemi baskılaması, bu maddelerin insektisit olarak *G. mellonella* ile entegre mücadele çalışmalarında ve böceğin doğal ortamında test edilmesi önerilmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Ahmad, A., 1993. Effect of  $\beta$ -ecdysone ingestion on total and differential haemocyte counts (THC & DHC) in the tobacco Caterpillar, *Spodoptera litura* Fabr. (Lepidoptera: Noctuidae), Bulletin of the Entomological Society of Egypt, 66, 113-122.
- Alberts, B., Molecular Biology of the Cell; New York and London: Garland Science, Fourth Edition, 2002, ISBN 0-8153-3218-1.
- Aldırmaz, N., Kurşun asetatın bir Decapoda türü olan *Palaemonetes turcorum*'un hepatopankreatik seka hücreleri üzerindeki ince yapı değişiklikleri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2004.
- 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, 688-96.
- Altuntaş, H., Şanal-Demirci, S. N. ve Duman, E., 2017. Evaluation of the effects of ethephon on the biological parameters of model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), Fresenius Environmental Bulletin, 26, 4, 2835-2839.
- Amiri-Besheli, B., Khambay, B., Cameron, S., Deadman, M. ve Butt, T., 2000. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium spp.*, and its significance to pathogenesis, Mycological Research, 104, 447-452.
- Andretic, R., Kim, Y., Jones, F. S., Han K. ve Greenspan, R. J., 2008. *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 51, 20392-20397.
- Androw, D. A., Ragsdale, D. W. ve Nyvall, R. F., 1997. Ecological Interactions and Biological Control, Westview Press, 334, Colorado.
- Arai, I., Ohta, M., Suzuki, A., Tanaka S., Yoshizawa, Y. ve Satoa, R. 2013. Immunohistochemical analysis of the role of hemocytin in nodule formation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, Journal of Insect Science, 12, 125. DOI:10.1673/031.013.12501.
- Ashida, M., Ochiai, M. ve Niki, T. 1988. Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of silkworm *Bombyx mori*, Tissue & Cell, 20, 599- 610.
- Atlı, E., Eshraghi, H. ve Orhan, A., 2020. Effects of Acute Sodium Nitrite and Sodium Nitrate on the Development of *Drosophila melanogaster*, Commagene Journal of Biology, 4, 2, 96-99.



- Bakar, E. ve Aktaç, T., 2014. Effects of sodium benzoate and citric acid on serum, liver and kidney tissue total sialic acid levels: An ultra structural study, Journal of Applied Biological Sciences, 8, 2, 9-15.
- Banakou, E. ve Dailianis, S., 2010. Involvement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and respiratory burst enzymes NADPH oxidase and NO synthase, in Cd-induced lipid peroxidation and DNA damage in haemocytes of mussels. Comparative Biochemistry & Physiology C, 152, 346-352.
- Bano, R., Khan, S. ve Shankity, I., 2014. The effect of preservatives and flavour additive on the production of oxygen-free radicals by isolated human neutrophils, International Journal of Nutrition and Food Sciences, 3, 3, 210-215.
- Banville, N., Fallon, J., McLoughlin, K. ve Kavanagh, K., 2011. Disruption of haemocyte function by exposure to cytochalasin b or nocodazole increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection, Microbes and Infection, 13, 14, 1191-1198.
- Barshop, B. A., Breuer, J. Holm, J. Leslie, J. ve Nyhan, W. L., 1989. Excretion of hippuric acid during sodium benzoate therapy in patients with hyperglycinaemia or hyperammonaemia, Journal of Inherited Metabolic Disease, 12, 1, 72-9.
- Beaulaton, J., 1979. Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms, Biochimie, 61, 157-164.
- Beerntsen, B. T., James, A. A. ve Christensen, B. M., 2000. Genetics of mosquito vector competence, Microbiology and Molecular Biology, 64, 115-137.
- Bergin, D., Reeves, E. P., Renwick, J., Wientjes, B. F. ve Kavanagh, K., 2005. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes, Infect Immun, 73, 7, 4161-4170.
- Bridges, J. W., French, M. R., Smith, R. L. ve Willians, R. T., 1970. The fate of benzoic acid in various species, Biochemical Journal, 118, 1, 47-51.
- Browne, N. ve Kavanagh, K., 2013. Developing the potential of using *Galleria mellonella* larvae as models for studying brain infection by *Listeria monocytogenes*, Virulence, 4, 4, 271-2.
- Browne, N., Hackenberg, F., Streciwilk, W., Tacke, M. ve Kavanagh, K., 2014. Assessment of in vivo antimicrobial activity of the carbene silver (I) acetate derivative SBC3 using *Galleria mellonella* larvae, BioMetals, 27, 4, 745-752.
- Büyükgüzel, E. ve Büyükgüzel, K., 2013. Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*, Cell Biology and Toxicology, 29, 2, 117-129.
- Cammack, R., Joannou, C. L., Cui, X. Y., Torres Martinez, C., Maraj, S. R. ve Hughes, M. N., 1999. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation, Biochimica et Biophysica Acta, 1411, 2, 475-488.

- Canyurt, M. A., Tarımda pestisit kullanımının su ürünleri üzerine etkileri, Kıyı Sorunları ve Çevre Sempozyumu, 1994, Kuşadası, Belediye Yayınları, 7, 345.
- Carmona, E. R., Escobar, B., Vales, G. ve Marcos, R., 2015. Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the comet assay in *Drosophila*, Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 778, 12-21.
- Cendoroglo, M., Jaber, B., Balakrishnan, L., Perianayagam, V. S., King, M. ve Pereira, B. J. G., 1999. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia, Journals of the American Society of Nephrology, 10, 93-100.
- Chen, Q., Huang, N., Huang, J., Chen, S., Fan, J., Li, C. ve Xie, F., 2009. Sodium benzoate exposure downregulates the expression of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter in dopaminergic neurons in developing zebrafish, Birth Defects Research (Part B), 91, 85-91.
- Cho, S. ve Kim, Y., 2004. Hemocytes apoptosis induced by entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* in *Bombyx mori*, Journal of Asia-Pacific Entomology, 7, 195-200.
- Christensen, B. M., Huff, B. M., Miranpuri, G. S., Harris, K. L. ve Christensen, L. A., 1989. Haemocyte population changes during the immune response of *Aedes aegypti* to inoculated microfilariae of *Dirofilaria immitis*, Journal of Parasitology, 75, 119-123.
- Ciz, M., Denev, P., Kratchanova, M., Vasicek, O., Ambrozova, G. ve Lojek, A., 2012. Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 8, 1-6.
- Coates, J. C., Lim, J., Harman, K., Rowley, A. F., Griffiths, D. J., Emery, H. ve Layton, W., 2018. The insect, *Galleria mellonella*, is a compatible model for evaluating the toxicology of okadaic acid, Cell Biology and Toxicology, 35, 219-232.
- Coelho, A., Fraichard, S., Le Goff, G., Faure, P., Artur, Y., Ferveur, J. F. ve Heydel, J. M., 2015. Cytochrome P450-dependent metabolism of caffeine in *Drosophila melanogaster*, Plos One, 10, 2, 1-15.
- Cook, S. M. ve McArthur, J. D., 2013. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens, Virulence, 4, 5, 350-3.

- Costa, S. C. P., Ribeiro, C., Girard, P. A., Zumbihl, R. ve Brehelin M., 2005. Modes of phagocytosis of Gram- positive and Gram- negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes, Journal of Insect Physiology, 51, 39-46.
- Çalışır, Z. E. ve Çalışkan, D., 2003. Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri, Ankara Eczacılık. Fak.ültesi Dergisi, 32, 3, 207-206.
- Çelik, D., Özbek, R. ve Uçkan, F., 2017. Effects of indole-3-acetic acid on hemocytes of *Achoria grisella* Fabr. (Lepidoptera: Pyralidae), Journal of the Entomological Research Society, 19, 2, 83-93.
- Da Silveira, E. B., Ribeiro, B. M. ve Bão, S. N., 2003. Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 35, 129-139.
- Dean, P., Richards, E. H., Edwards, J. P., Reynolds, S. E. ve Charnaley, A. K., 2004. Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*, Developmental and Comparative Immunology, 28, 689-700.
- Debnath, L. R., Rajak, P. ve Pal, A. K. 2017. The mechanisms of innate immunity in insects., Brojendra Nath Seal Journal of Science, 9, 1, 146-159.
- Dere, B., Altuntaş, H. ve Nurulloğlu, Z. U., 2015. Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 89, 138-152.
- Deriagina, V. P, lu V, M. ve Il'nitskii, A. P., 2003. Experimental study of the effect of sodium nitrate on the functional neutrophil and macrophage activity, Biomed Khim, 49, 19-26.
- Desbois, A. P. ve Coote, P. J. 2012. Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents, Advances in Applied Microbiology, 5, 25-53.
- Desbois, A. P. ve Coote, P. J., 2011. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): An in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66, 8, 1785-1790.

- Desbois, A. P. ve McMillan, S., 2015. Paving the way to acceptance of *Galleria mellonella* as a new model insect, Virulence, 6, 5, 410-411.
- Deshpande, S. S., 2002. Handbook of Food Toxicology, New York: Marcel Dekker Inc., 219-284.
- Dolan, N., Gavin, D. P., Eshwika, A., Kavanagh, K., McGinley, J. ve Stephens, J. C., 2016. Synthesis, antibacterial and anti-MRSA activity, *in vivo* toxicity and a structure-activity relationship study of a quinoline thiourea, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 26, 2, 630-635.
- Eberechukwu, S., Amadikwa, A. ve Okechukwu, M., 2007. Effect of oral intake of sodium benzoate on some haematological parameters of wistar albino rats, Scientific Research and Essays, 2, 1.6-9.
- Er, A., Taşkıran, D. ve Sak, O., 2017. Azadirachtin-induced effects on various life history traits and cellular immune reactions of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), Archives of Biological Sciences, 69, 2, 335-344.
- Erkan T., 2010. Gıdalardaki katkı maddeleri, Türk Pediatri Arşivi, 45, 315-318.
- Erkmen, O. ve Bozoglu, T. F., 2008. Food Microbiology III: Food Preservation, Ankara, İlke Publishing Company.
- Esin, T., 1990. Depolanan Kuru Tarımsal Ürünlere Arız Olan Hastalık ve Zararlılar, TMO Alkasan Matbaası. Ankara.
- Fallon, J. P., Reeves, E. P. ve Kavanagh, K., 2010. Inhibition of neutrophil function following exposure to the *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin, Journal of Medical Microbiology, 59, 6, 625-633.
- Fallon, J., Kelly, J. ve Kavanagh, K., 2012. *Galleria mellonella* as a model for fungal pathogenicity testing, Methods in Molecular Biology, 845, 469-85.
- Faulds, W., 1991. Spread of *Bracon phylacteophagus*, a biocontrol agent of *Phylacteophaga froggatti*, and impact on host, New Zealand Journal of Forestry Science, 21, 2/3, 185.
- Fearon, D.T., 1997. Seeking wisdom in innate immunity, Nature, 388, 323-324.
- Femi-Oloye, O. P., Owoloye, A., Olatunji-Ojo, A. M., Abiodun, A. C., Adewumi, B., Ibitoye, B. O., Oloye, F. F, Izegaegbe, J. I., Adebayo, T. M., Adedoja, A. J., Oginni, O. P., Gbore, F. A. ve Akinwumi, F. O., 2020. Effects of commonly used food additives on haematological parameters of Wistar rats, Heliyon, 6, e05221.
- Feyereisen, R., 1999. Insect P450 enzymes, Annual Review of Entomology I, 44, 507-533.
- Fisher 2014. Sodium Nitrate and Sodium Benzoat Safety Data Sheet, AquaPhoenix Scientific, Barnhart Drive, Hanover, PA, 17331.

- Fisher 2019. Sodium Nitrite Safety Data Sheet, Bishop Meadow Road, Loughborough, Leicestershire LE11 5RG, United Kingdom.
- Gardiner, E. M. M. ve Strand, M. R., 2000. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*, Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 43, 147-164.
- Gaur, H., Purushothaman, S., Pullaguri, N., Bhargava, Y. ve Anamika Bhargava, A., 2018. Sodium benzoate induced developmental defects, oxidative stress and anxiety-like behaviour in zebrafish larva, Biochemical and Biophysical Research Communications, 502, 364e369.
- Glatz, R. V., Asgari, S. ve Schmidt, O., 2004. Evolution of polydnaviruses as insect immune suppressors, Trends in Microbiology, 12, 545-554.
- Glupov, V. V., Khvoshevskaya, M. F., Lovinskaya, Y. L., Dubovski, I. M., Martemyanov, V. V. ve Sokolova, J. Y., 2001. Application of the nitroblue tetrazolium reduction method for studies on the production of reactive oxygen species in insect haemocytes, Cytobios, 106, 165-178.
- Götz, P. ve Boman, H. G., 1985. Insect immunit, In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, 3, 453-485.
- Grunwald, S., Adam, I. V., Gurmai, A. M., Bauer, L., Boll, M. ve Wenzel, U., 2013. The red flour beetle *Tribolium castaneum* as a model to monitor food safety and functionality, Advances in Biochemical Engineering, 135, 111-112.
- Gupta, A. P., 1985. Cellular Elements in the Hemolymph, In: Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology, 3, 401-451.
- Gupta, A. P., Arthropod haemocytes and phylogeny. In: Gupta AP, editor. Arthropod phylogeny. New York: Van Nostrand Reinhold, 1979, 669-735.
- Gwokyalaya, R. ve Altuntaş, H., 2019. Boric acid-induced immunotoxicity and genotoxicity in model insect *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 101, e21588.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C., 2007, Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, New York, A.B.D.
- Hamamoto, H., Kurokawa, K., Kaito, C., Kamura, K., Razanajatovo, I. M., Kusuhara, H., Santa, T. ve Sekimizu, K., 2004. Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms, Antimicrob Agents Chemother, 48, C2, 774779.
- Hamamoto, H., Tonoike, A., Narushima, K., Horie, R. ve Sekimizu, K., 2009. Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism, Comparative Biochemistry and Physiology-C Toxicology and Pharmacology, 149, 3, 334-339.

- Haschek, W. M. ve Rousseaux, C. G., 1998. Fundamentals of toxicologic pathology, Academic Press, Londra, B. K.
- Himri, I., Abdelkarim, G., Souana, F. ve Saalaoui, E., 2013. Toxicity testing of tartrazine using the nematode *Caenorhabditis elegans*, brine shrimp larvae (*Artemia salina*) and KGN granulosa cell line, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3, 11, 51–58.
- Hirashima, Y., Miura, K., Miura, T. ve Matsuda, S., 1990. Studies on the biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), functional responses of the egg-parasitoids *Trichogramma ostriniae* to host densities, Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 44, 3, 89-93.
- Hu, M., Wang, J., Cai, J., Wu, Y. ve Wang, X., 2008. Analysis of sodium benzoate biotoxicity by atomic force microscope, Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 24, 8, 1428-32.
- Hunt, P. R., 2017. The *C. elegans* model in toxicity testing, Journal of Applied Toxicology, 37, 1, 50-59.
- Irving, P., Ubeda, J., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J., Hetru, C. ve Meister, M., 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genomewide analysis, Cellular Microbiology, 7, 3, 335-350.
- Ishay, J. S. ve Paniry, V. A., 1979. Effects of caffeine and various xanthines on hornets and bees, Phytopharmacology, 65, 3, 299-309.
- James, R. R. ve Xu, J., 2011. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity, Journal of Invertebrate Pathology, 109, 175-182.
- Jander, G., Rahme, L. G. ve Ausubel, F. M., 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects, Journal of Bacteriology, 182, 13, 3843-3845.
- Johny, S., Lange, C. E., Solter, L. F., Merisko, A. ve Whitman, D. W., 2007. New insect system for testing antibiotics, The Journal of Parasitology, 93, 6, 1-7.
- Jouve, J. L., Carlier, V. ve Rozier, J., 1980. Antimicrobial effects of nitrates in meat products, Annals of Nutrition and Metabolism, 34, 5, 807-26.
- Junqueira, J. C., 2012. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives, Virulence, 3, 6, 474-476.
- Kanost, M. R., Jiang, H. ve Yu, X. Y., 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*, Immunological Reviews, 198, 97-105.
- Kavanagh, K. ve Fallon, J. P., 2010. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence, Fungal Biology Reviews, 24, 1–2, 79-83.

- Kavanagh, K. ve Reeves, E. P., 2004. Exploiting the potential of insects for in-vivo pathogenicity testing of microbial pathogens, FEMS Microbiology Reviews, 28, 1, 101-112.
- Kelly, J., ve Kavanagh, K., 2011. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response, Journal of Medical Microbiology, 60, 2, 189-196.
- Kemp, M. W., ve Massey, R. C., 2007. The use of insect models to study human pathogens, Drug Discovery Today, 4, 3, 105-110.
- Khodaei, F., Kholghipour, H., Hosseinzadeh, M. ve Rashedinia, M., 2019. Effect of sodium benzoate on liver and kidney lipid peroxidation and antioxidant enzymes in mice, Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences, DOI: 10.4103/jrptps.JRPTPS\_68\_18.
- Kosmider, B., Zyner, E., Osiecka, R. ve Ochocki, J., 2004. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3- aminoflavone in comparison with cis-DDP, Mutation Research, 563, 61-70.
- Kumar, V., Cotran, R. S. ve Robbins, S. L., 2003. The liver and biliary tract, Robbins Basic Pathology, Elsevier Saunders, Philadelphia, A.B.D., 592- 633.
- Kurihara, Y., Shimazu, T. ve Wago, H., 1992. Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) II. Possible roles of granular plasmatocytes and enocytoids in the cellular defense reactions, Applied Entomology and Zoology, 27, 237-242.
- Kurt, D. and Kayis, T., 2015. Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*, Turkish Journal of Zoology, 39, 452-457.
- Lavine, M. D. ve Strand, M. R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32, 1295-1309.
- Le, N. T., Asgari, S., Amaya, K., Tan, F. F. ve Beckage, N. E., 2003. Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, Journal of Insect Physiology, 49, 533-543.
- Levin, D. M., 2007. An integrin required for the encapsulation immune response in the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae), Doktora Tezi, Kansas State University, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas.
- Li, J., Zhao X. ve Christensen, B. M., 1994. Dopachrome conversion enzyme in *Aedes aegypti*: Significance during melanotic encapsulation of parasites and cuticular tanning, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 24, 1043-1049.

- Lionakis, M. S. ve Kontoyiannis, D. P., 2005. Fruit flies as a minihost model for studying drug activity and virulence in *Aspergillus*, Medical Mycology, 43, 1, 111-114.
- MacCallum, D. M., Desbois, A. P. ve Coote, P. J., 2013. Enhanced efficacy of synergistic combinations of antimicrobial peptides with caspofungin versus *Candida albicans* in insect and murine models of systemic infection, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 32, 8, 1055-1062.
- Maguire, R., Duggan, O. ve Kavanagh, K., 2016. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model for assessing the relative toxicity of food preservative agents, Cell Biology and Toxicology, 32, 209-216.
- Maguire, R., Kunc, M., Hyrsi, P. ve Kavanagh, K. 2017. Analysis of the acute response of *Galleria mellonella* larvae to potassium nitrate, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 195, 44-51.
- Mamur, S., Ataseven, N., Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D., 2018. Gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat ve potasyum sorbat karışımının genotoksik potansiyelinin mikronukleus testi ile belirlenmesi, BAUN Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 20, 2, 235-245.
- Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. ve Aksoy, H., 2012. Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes *in vitro*, Cytotechnology, 64, 553-562.
- Maurer, E., Browne, N., Surlis, C., Jukic, E., Moser, P., Kavanagh, K., Lass-Flörl, C. ve Binder, U., 2015. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance, Virulence, 6, 6, 591-598.
- McMillan, S., Verner-Jeffreys, D., Weeks, J., Austin, B. ve Desbois, A. P., 2015. Larva of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, is a suitable alternative host for studying virulence of fish pathogenic *Vibrio anguillarum*, BMC Microbiology, 15, 1, 1-10.
- Miller, J. S., Nguyen, T. ve David, W. S., 1993. Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections, National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 12418-12422.
- Mizerska-Dudka, M. ve Andrejko, M., 2012. *Galleria mellonella* hemocytes destruction after infection with *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Basic Microbiology, 54, 232-246.
- Montella, I. R., Schama, R. ve Valle, D., 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance-a review, Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 107, 4, 437-49.
- Mowlds, P. ve Kavanagh, K., 2008. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*, Mycopathologia, 165, 1, 5-12.



- Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E. ve Lialiaris, T., 2008. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives, Food and Chemical Toxicology, 46, 7, 2390-2393.
- Mukherjee, K., Hain, T., Fischer, R., Chakraborty, T. ve Vilcinskas, A., 2013. Brain infection and activation of neuronal repair mechanisms by the human pathogen *Listeria monocytogenes* in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*, Virulence, 4, 4, 324-32.
- Mylonakis, E., Moreno, R., El, J. B., Idnurm, A., Heitman, J., Stephen, B., Ausubel, F. M., Diener, A El Khoury, J. B. ve Calderwood, S. B., 2005. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis, Infection and Immunity, 73, 7, 3842-2850.
- Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M. ve Kamimura, M., 2010. Two hemocytelineages exist in silkworm larval hematopoietic organ, Plos One, 5, e11816.
- Nakahara, Y., Nakamura, M., Hiraoka, T. ve Iwabuchi, K., 2003. Insect lipophorin and vertebrate lipoproteins support larval development of the endoparasitoid *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae) as dietary lipid sources, Applied Entomology and Zoology, 37, 4, 637-643.
- Nakayama, S., Sasaki, K., Matsumura, K., Lewis, Z. ve Miyatake, T., 2012. Dopaminergic system as the mechanism underlying personality in a beetle, Journal of Insect Physiology, 58, 5, 750-755.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. ve Carton, Y., 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity, Nitric Oxide, 4, 423-430.
- Nardi, J. B., Pilas, B., Ujhelyi, E., Garsha, K. ve Kanost, M. R., 2003. Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages, Development Genes and Evolution, 213, 10, 477-491.
- Nation J. L., 2002. Insect Physiology and Biochemistry, CRC press, Boca Raton, London, Newyork, Washington, D. C., 68-75.
- Nigam, P. K. ve Nigam, A., 2010. Botulinum Toxin, Indian Journal of Dermatology, 55, 1, 8-14.
- Omaye, S. T., 2004. Food and nutritional toxicology, New York, CRC Press.
- Özdemir, H., Turhan, A. B. ve Arıkoğlu, H., 2012. Potasyum sorbat, sodyum benzoat ve sodyum nitrit'in genotoksik etkilerinin araştırılması, European Journal of Basic Medical Sciences, 2, 2, 34-40.
- Pandey, J. P., Upadhyay, A. K. ve Tiwari, R. K., 2007. Effects of some plant extracts on hemocyte count and molting of *Danaus chrysippus* larvae, Journal of Advanced Zoology, 28, 14-20.

- Parakash, M., 2008. Insect Physiology, Encyclopedia of Entomology-3. Discovery Pub. House Pvt. Ltd., New Delhi, India, 216-257.
- Pech, L. L. ve Strand M. R., 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes, JJournal of. Cell Science, 109, 2053-2060.
- Pech, L.L. ve Strand, M. R., 2000. Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells, Journal of Insect Physiology, 46, 1565-1473.
- Pendland, J. C. ve Boucias, D. G., 1996. Phagocytosis of lectin-opsonized fungal cells and endocytosis of the ligand by insect *Spodoptera exigua* granular hemocytes: an ultrastructural and immunocytochemical study, Cell Tissue Research, 285, 57-67.
- Perlman, R. L., 2016. Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective, Evolution, Medicine, and Public Health, 1, 170-176.
- Pongsavee, M., 2015. Effect of sodium benzoate preservative on micronucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes, BioMed Research International, 2015, 1-5.
- Radwan, E. H., 2020. Adverse Effect of Mixture of Food Additives on Some Biochemical Parameters in Male Albino Rats, Journal of Advances in Biology, 13, 1-13.
- Radwan, E. H., Elghazaly, M. M., Kh Hussein, H., Abdel Aziz, K. K. ve Barakat, A., 2020. The possible effects of sodium nitrite and sodium benzoate as food additives on the liver in male rats, Journal of Advances in Biology, 13, 14-30.
- Rajak, P., Dutta, M. ve Roy, S., 2015. Altered differential hemocyte count in 3rd instar larvae of *Drosophila melanogaster* as a response to chronic exposure of Acephate. Interdiscip, Toxicology, 8, 84-88.
- Rangan, C. ve Barceloux, D. G., 2009. Food additives and sensitivities, Dis Mon, 55, 5, 292-311.
- Ratcliffe, N. A. ve Rowley, A. F., 1975. Cellular defense reaction of insect haemocytes, in vitro: phagocytosis in a new suspension culture system, Journal of Invertebrate Pathology, 26, 225-233.
- Reeves, E. P., Lu, H., Hugues Lortat, J., Messina, C. G., Bolsover, S., Gabella G., Potma, E. O., Warley, A., Roes, J. ve Segal. A. W., 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sub>+</sub> flux, Nature, 416, 291-297.
- Renwick, J., Reeves, P. E., Wientjes, F. B. ve Kavanagh, K., 2007. Translocation of proteins homologous to human neutrophil p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> to the cell membrane in activated hemocytes of *Galleria mellonella*, Developmental and Comparative Immunology, 31, 4, 347-359.
- Ribeiro, C. ve Brehelin, M., 2006. Insect haemocytes: What type of cell is that?, Journal of Insect Physiology, 52, 417-429.

- Ribeiro, C., Simoes, N. ve Brehelin, M., 1996. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions: in vivo and in vitro studies, Journal of Insect Physiology, 42, 815-822.
- Richards, E. H. ve Dani, M. P., 2008. Biochemical isolation of an insect haemocyte anti-aggregation protein from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and identification of its gene, Journal of Insect Physiology, 54, 1041-1049.
- Richards, E. H. ve Edwards, J. P., 2002. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation *in vivo*, Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 49, 108-124.
- Rowan, R., Moran, C. ve McCann, M., 2009. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag 2(mal)(phen)3], Biometals, 22, 461-467.
- Rowley, A. F. ve Ratcliffe, N. A., Insects, In: Invertebrate Blood Cells, Academic Press, 2, London, 1981, 421-488.
- Rubinstein, A. L., 2006. Zebrafish assays for drug toxicity screening Zebrafish assays for drug, Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2, 2, 231-240.
- Russell, N. J. ve Grahame, G. W., 2003. Food Preservatives, 2nd Plenum Publishers, New York.
- Salem, H. M., Hussein, M. A., Hafez, S. E., Hussein, M. A. ve Sayed, R. M., 2014. Ultrastructure changes in the haemocytes of *Galleria mellonella* larvae treated with gamma irradiated *Steinernema carpocapsae* BA2, Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 7, 74-79.
- Santoyo-Gonzalez, I. ve Aguilar-Cordoba, A., 2011. Phenoloxidase: A key component of the insect immune system, Entomologia Experimentalis et Applicata, 142, 1-16.
- Saraç, H. ve Sarı, M. 2019. Determination of the effects of food preservatives benzoic acid and sodium nitrate on lifespan, fertility and physical growth in *Caenorhabditis elegans*, Journal of Survey in Fisheries Sciences, 6, 1, 49-63.
- Sarıkaya, R. ve Çakır, S., 2005. Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test, Environmental Toxicology and Pharmacology, 20, 3, 424-430.
- Schmidt, O., Theopold, U. ve Strand, M., 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by Hymenopteran endoparasitoids, BioEssays, 23, 344- 351.
- Selçukoğlu, E., 1999. Çukurova Bölgesi'nde toplanan bal örneklerinden amitraz ve fulvalinate kalıntılarının belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 1999.

- Sendi, J. J. ve Salehi, R., 2010. The effect of methoprene on total hemocyte counts and histopathology of hemocytes in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera), Munis Entomology & Zoology, 5, 240-246.
- Shapiro, M., 1979. Changes in hemocyte population, Insect hemocytes. New York, London: Cambridge University Press, 475-523.
- Silva, J. E. B., Boleli, I. I. C. ve Simões, Z. L. P., 2002. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae, Brazilian Journal of Biology, 62, 4A, 689-699.
- Sindelar, J. J. ve Milkowski, A. L., 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet, Nitric Oxide, 26, 259-266.
- Slepneva, I. A., Glupov, V. V., Sergeeva, S. V. ve Khramtsov, V. V., 1999. EPR detection of reactive oxygen species in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Dendrolimus superans sibiricus* (Lepidoptera) larvae, Biochemical and Biophysical Research Communications, 264, 212-215.
- Smoot, L. A. ve Pierson, M. D., 1982. Inhibition and control of bacterial spore germination, Journal of Food Protection, 45, 84-92.
- Soós, I. ve Szabad, J., 2014. Assaying benzene, a parquet varnish, and a synthetic thinner with respect to induction of in vivo chromosome loss in wing primordial cells of *Drosophila*, Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 763, 18-22.
- Strand, M. R., 2008. The insect cellular immune response, Insect Science, 15, 1, 1-14.
- Tembhare, D. B., 2016. Modern Entomology. 2nd edition, 470-476.
- Terahara, K., Takahashi, K. G. ve Mori, K., 2003. Apoptosis by RGD containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Developmental & Comparative Immunology, 27, 521-528.
- Teramoto, T. ve Tanaka, T., 2004. Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*, Journal of Insect Physiology, 50, 1103-1111.
- Tsai, C. J. Y., Loh, J. M. S. ve Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing, Virulence, 7, 3, 214-229.
- Tsay, H. J., Wang, Y. H., Chen, W. L., Huang, M. Y. ve Chen, Y. H., 2007. Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae, Neurotoxicology and Teratology, 29, 5, 562-569.
- Turnbull, M. W., Martin, S. B. ve Webb, B. A., 2004. Quantitative analysis of hemocyte morphological abnormalities associated with *Campoplex sonorensis* parasitization, Journal of Insect Science, 4, 11-26.

- Uçkan, F., Er, A. ve Ergin, E., 2010. Levels of encapsulation and melanization in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized and envenomated by *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), Journal of Applied Entomology, 134, 718-726.
- URL-1, <https://www.worldometers.info/world-population/>,04.12.2020
- URL-2, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm>https, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, 25.12.2020.
- Vilcinskas, A., Matha, V. ve Götz, P., 1997. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*, Journal of Insect Physiology, 43, 1149-1159.
- Vilmos, P. ve Kurucz, E., 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system, Immunology Letters, 62, 59-66.
- Walker, R., 1990. Toxicology of sorbic acid and sorbates, Food Additive Contamination, 7, 5, 671-676.
- Wharton, R. A. 1993. Bionomics of the Braconidae, Annual Review of Entomology, 38, 121-143.
- WHO, 2016. Evaluation of certain food additives and contaminants.
- Wibbertmann, A., Kielhorn, J., Koennecker, G., Mangelsdorf, I. ve Melber, C., 2000. Concise International Chemical Assessment Document 26: Benzoic Acid and Sodium Benzoate. Geneva: World Health Organization.
- Wojda, I., 2017. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*, Insect Science, 24, 342-357.
- Wu, G., Liu, Y., Ding, Y. ve Yi, Y., 2016. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity, Tissue and Cell, 48, 297-304.
- Wu, M. N., Ho, K., Crocker, A., Yue, Z. ve Koh, K., 2010. The effects of caffeine on sleep in *Drosophila* require pka activity, but not the adenosine receptor, Journal of Neuroscience, 29, 35, 11029-11037.
- Wu, Y. Y., Zhou, T., Wang, Q., Dai, P. L., Xu, S. F., Jia, H. R. ve Wang, X., 2015. Programmed cell death in the honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) worker brain induced by imidacloprid, Journal of Economic Entomology, 108, 1486-1494.

- Yassine, H., Kamareddine, L. ve Osta, M. A., 2012. The mMosquito mMelanization rResponse iIs iImplicated in dDefense against the eEntomopathogenic fFungus *Beauveria bassiana*, PLoS Pathogens, 8, 11, e1003029.
- Yavav, A., Kumar, A., Das, M. ve Tripathi, A., 2016. Sodium benzoate, a food preservative, affects the functional and activation status of splenocytes at non cytotoxic dose, Food and Chemical Toxicology, 88, 40-47.
- Yılmaz, S., Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D., 2009. The in vitro genotoxicity of benzoic acid in human peripheral blood lymphocytes, Cytotechnology, 60, 1-3, 55.
- Yörük, N. G. ve Danyer, E., 2016. Gıda katkı maddeleri genel bilgiler ve tanımlar, Türkiye Klinikleri Food Sciences - Special Topics, 2, 2, 1-10.
- Yücel, S. M. ve Kayış, T., 2019. Imidacloprid induced alterations in oxidative stress, biochemical, genotoxic, and immunotoxic biomarkers in non-mammalian model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), Journal of Environmental Science and Health B, 54, 1, 27-34.
- Zdybicka-Barabas, A., Mak, P., Jakubowicz, T. ve Cytrynska, M., 2014. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*, Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 87, 1-12.
- Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. ve Aksoy, H., 2011. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate, Food and Chemical Toxicology, 49, 4, 763-769.
- Zhang, G. ve Ma, Y., 2013. Spectroscopic studies on the interaction of sodium benzoate, a food preservative, with calf thymus DNA, Food Chemistry, 141, 1, 41-47.
- Zhu, Q., He, Y., Yao, J., Liu, Y., Tao, L. ve Huang, Q., 2012. Effects of sublethal concentrations of the chitin synthesis inhibitor, hexaflumuron, on the development and hemolymph physiology of the cutworm, *Spodoptera litura*, Journal of Insect Science, 12, 1-13.

## ÖZGEÇMİŞ

1. Hava İkmal ve Bakım Merkezi İlköğretim Okulunda, ortaöğretimini Yunusemre Lisesinde Eskişehir’de tamamladı. Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünden bölüm ikincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda başlamış olduğu yüksek lisans sürecinde Tübitak Projesinde bursiyer olarak görev aldı. Anadolu Üniversitesinde lisansüstü eğitimine devam ederken Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Bilim Dalı için açılan Araştırma Görevlisi kadrosuna başvuruda bulundu ve akademik sınavda sağlamış olduğu başarı ile bu bölüme atandı. 2018 yılından itibaren Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrencisi olarak lisansüstü eğitimine başlayıp, aynı zamanda Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Bilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir. Yabancı dili İngilizce’dir.