

GIDA MATRİSİ VE MİKROPLASTİK ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF FOOD MATRIX AND MICROPLASTIC INTERACTION

NAZIM SERGEN MISIRLI

DOÇ. DR: FAHRİYE CEYDA DUDAK ŞEKER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

GIDA MATRİSİ VE MİKROPLASTİK ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

Nazım Sergen MISIRLI

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahriye CEYDA DUDAK ŞEKER

Haziran 2022, 65 sayfa

Plastik üretimi son yıllarda artarak katlanmıştır ve 2019 yılında Avrupa’da 57.9 milyon tona, dünyada ise 368 milyon tona ulaşmıştır. Plastik polimerler günümüzde paketleme, tarım, günlük ihtiyaç gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Polistiren Avrupa’da en çok kullanılan polimerler arasındadır. Plastik parçacıklar arasında boyutu 5 mm’den küçük boyutta olanlar mikroplastik (MP) olarak tanımlanmaktadır. Mikroplastikler bu zamana kadar doğada atmosferde, okyanuslarda, göllerde, tarımsal arazilerde ve midye, konserve balık, tuz, paketlenmiş et ürünleri ve şişelenmiş sular gibi yiyecek ve içeceklerde tespit edilmiştir. Mikroplastiklerin gıdalarda bulunmasından dolayı diyet yolu ile tüketilebilmekte ve bu durum insan sağlığına tehdit oluşturmaktadır. Bunun sonucunda mikroplastiklerin, inflamasyona, organlarda birikime, sitotoksositeye neden oldukları ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu indükledikleri gözlemlenmiştir. Partiküller protein içeren biyolojik çözeltilerin içinde, çözeltideki bazı proteinler partikül yüzeyini veya bir kısmını kaplamakta ve “protein korona” adı verilen bir yapı oluşmaktadır. Oluşan protein korona yapısı sitotoksitesi de dahil olmak üzere partikülün birçok özelliğini etkilemektedir.

Bu tez çalışmasında, polistiren mikroplastığının (PSMP) gerçek gıda ortamı ile etkileşiminin incelenmesi ve sindirimin korona yapısında oluşturduğu değişikliklerin

araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda yağlı ve yağsız süt örnekleri ile etkileştirilen PSMP'lerin hidrodinamik çaplarında anlamlı bir değişim olmadığı ancak ζ -potansiyellerinin azaldığı belirlenmiştir. Partikül yüzeyinde oluşan protein korona yapısında çoğunlukla, sütte bulunan α ve β -kazein fraksiyonlarının bulunduğu gözlemlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında PSMP'ler ve süt ile etkileştirilmiş PSMP'lere *in-vitro* sindirim simülasyonu uygulanmış ve sindirimin partikül özellikleri ve korona yapısı üzerine etkisi incelenmiştir. Süt örnekleri ile etkileştirilen ve sindirime maruz kalan PSMP'lerin protein korona yapısının incelendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca sindirim boyunca partiküllerin sindirim sıvısındaki enzimleri de bağladığı gözlemlenmiştir. Süt ile etkileştirilmemiş PSMP'lerin sindirim boyunca korona yapısı oluşturduğu ve sindirim sonuna kadar artarak devam ettiği gösterilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında, süt ile etkileştirilmiş ve etkileştirilmemiş PSMP'lerin sindirim öncesi ve sonrasında, Caco-2 hücresi üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Sitotoksitesite analizleri sonucunda protein korona yapısının hücre canlılığı üzerinde bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Korona yapısına sahip partiküllerin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı görülmekle birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bu tez çalışmasının sonunda, PSMP'lerin gerçek bir gıda ortamı ile etkileşimi sonucunda protein korona yapısı oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu oluşan korona yapısının sindirim simülasyonu boyunca değiştiği gösterilmiştir. PSMP örnekleri Caco-2 hücreleri üzerinde hücre canlılığını etkilememiştir. Ancak, oluşan korona yapısının ve *in-vitro* sindirim simülasyonunun partiküllerin sitotoksitesitesi üzerinde etkisi olmadığı saptanmıştır. Bu tez çalışmasında ilk kez, dünyada kirliliği gittikçe artan ve artık gıdalarımızda bulunmaya başlayan mikroplastiklerden biri olan polistiren mikroplastığının gerçek bir gıda ile etkileşimi ve bu etkileşimin partiküllerin karakteristik özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Polistiren mikroplastik, protein korona, *in-vitro* sindirim, *in-vitro* toksitesite, süt

ABSTRACT

INVESTIGATION OF FOOD MATRIX AND MICROPLASTIC INTERACTION

Nazım Sergen MISIRLI

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Ass. Prof. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER

June 2022, 65 pages

Plastic production has multiplied over the last years and reached 57.9 million tonnes in Europe and 368 million tonnes in World in 2019. Plastic polymers are used in wide areas including packaging, agriculture, household etc. Among plastic particles, less than 5 mm are considerable as microplastic (MP). Nowadays, microplastic pollution has been found in the atmosphere, oceans, lakes, agricultural soils, and foods and beverage like mussels, canned fish, salt, packaged meats, and bottled water. Due to microplastics present in foods, they can be consumed via diet and this situation create a threat to human health. As a result, microplastics cause inflammation, cytotoxicity, accumulation in organs, and induce reactive oxygen species have been observed. In biological solutions that contain proteins, some proteins in the solution cover the particle surface or a part of it and a structure called “protein corona” is formed. The resulting protein corona structure affects many properties of the particle, including its toxicity.

In this thesis, it is aimed to examine the interaction of polystyrene microplastic (PSMP) with real food environment and to investigate the changes in the corona structure of digestion. As a result of the studies, it was determined that there was no significant change in the hydrodynamic diameters of PSMPs interacted with fat and skim milk samples, but

their ζ -potentials decreased. It has been observed that the protein corona structure formed on the particle surface mostly contains α and β -casein fractions found in milk. In the second stage of the study, *in-vitro* digestion simulation was applied to PSMPs and PSMPs interacted with milk samples and the effect of digestion on particle properties and corona structure was investigated. It was observed that the protein corona structure of PSMPs interacted with milk samples and exposed to digestion was thinned. It has also been observed that the particles bind enzymes in the digestive juices during digestion. It has been shown that PSMPs not interacted with milk form a corona structure during digestion and continue to increase until the end of digestion.

At the final stage of study, the toxic effect of PSMPs interacted and not interacted with milk on Caco-2 cell before and after digestion were investigated. As a result of cytotoxicity analysis, it was observed that the protein corona structure did not have an effect on cell viability. Although it was observed that particles with a corona structure reduced the formation of reactive oxygen species, this difference was not statistically significant.

At the end of this study, it has been shown that PSMPs form protein corona structure as a result of their interaction with real food environment. It has also been shown that this formed corona structure changes throughout the digestion simulation. PSMP samples did not affect cell viability on Caco-2 cells. However, it was determined that the formed corona structure and *in-vitro* digestion simulation had no effect on the cytotoxicity of the particles. In this thesis, for the first time, the interaction of polystyrene microplastic, which is one of the microplastics that are increasingly polluted in the World and starting to be found in our food, with real food and the effects of this interaction on characteristics of the particles were investigated.

Keywords: Polystyrene microplastic, protein corona, *in-vitro* digestion, *in-vitro* toxicity, milk

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans tez çalışmam boyunca benden tecrübesini, bilgisini, zamanını ve özellikle sabrını esirgemeyen, çalışmam boyunca yaşadığım her türlü sorunda ve herhangi bir konuda kazandırdığı yeni bakış açıları için tez danışmanım sayın Doç. Dr. Fahriye Ceyda Dudak Şeker'e tüm kalbimle teşekkür ederim kendisine minnettarım.

Yüksek lisans araştırmam ve çalışmam boyunca birlikte çalışmaktan mutlu olduğum, her konuda fikirlerini, önerilerini ve yardımlarını esirgemeyen ve harika arkadaşlıkları için sevgili çalışma arkadaşlarım Nurdan Ersöz, Hafize Öz, Emine Merve Çanga, Berfin Ece Şen Yeşilyurt ve Kamil Urgan'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Deneyisel çalışmalarım boyunca benden yardımını ve fikrini esirgemeyen Ar. Gör. Seda Elikođlu'na çok teşekkür ederim. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünün sayın öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve personellerine sağladıkları kolaylık ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam ve hayatımın büyük bir bölümü boyunca dostluklarını benden eksik etmeyen sevgili Emin Alp Ardıç, Burak Cem Şayan, Egeberk Özberk, Giray Akbay, Mert Keskin'e

Son olarak hayatta her zaman yanımda olan ve benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Hüseyin Mısırlı, annem Jale Mısırlı ve kardeşim Batıkan Serhan Mısırlı'ya teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2558 Tayland Ulusal Bilim ve Teknoloji Kalkınma Ajansı (NSTDA) ile İkili İşbirliği Programı ve 1002-119N024 kodlu proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikroplastikler.....	3
2.2. Protein Korona	5
2.3. Toksikolojik Çalışmalar	7
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	10
3.1. Materyal	10
3.1.1. Kimyasal Malzemeler.....	10
3.2. Metot	10
3.2.1. Süt Kompozisyonunun Belirlenmesi.....	10
3.2.2. Partikül Karakterizasyonu ve Gıda Matrisi ve Partikül Etkileşimi	11
3.2.3. Sindirim Simülasyonu	11
3.2.4. Elektron Mikroskop Görüntüleri	13
3.2.5. Hidrodinamik Çap ve Zeta Potansiyel Ölçümü.....	13
3.2.6. Floresans İşaretleme ile Protein Tayini	13
3.2.7. SDS-PAGE	14
3.2.8. <i>In-vitro</i> Toksikite	17
3.2.8.1 MTT ile Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	18
3.2.8.2 Toplam Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü	18
3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme.....	19
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	20
4.1. Süt Kompozisyonu ve Partikül Karakterizasyonu	20
4.2.1. Gıda Matrisinin Partikül Özellikleri Üzerine Etkisi.....	22

4.2.2. Protein Korona Yapısının Karakterizasyonu.....	27
4.3. <i>In-vitro</i> Sindirim Simülasyonu.....	31
4.3.1. <i>In-vitro</i> Sindirim Simülasyonunun Partikül Özellikleri Üzerine Etkisi	32
4.3.2. <i>In-vitro</i> Sindirim Simülasyonu Sonrası Protein Korona Yapısının Karakterizasyonu	39
4.4. <i>In-vitro</i> Toksisite.....	47
4.4.1. MTT ile Sitotoksisite Analizi	47
4.4.2. Toplam ROS Ölçümü.....	49
5. YORUM.....	52
6. KAYNAKLAR	55
EKLER.....	64
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	64
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Çalışma kapsamında kullanılan PSMP'lerin A) 1000x ve B) 80000x büyütme değerlerindeki ESEM görüntüleri.	21
Şekil 4.2. Çalışma kapsamında kullanılan PSMP'lerin (3 mg/mL) DLS spektrumu.	21
Şekil 4.3. PSMP'lerin A) yağlı süt örneği ve B) yağsız süt örneği ile etkileştirildikten sonra elde edilen 1000x (soldaki) ve 80000x (sağdaki) büyütme değerlerindeki ESEM görüntüleri.	23
Şekil 4.4. PSMP'lerin A) süt örneği ile etkileştirilmeden ve B) yağsız süt ile etkileştirildikten sonra elde edilen TEM görüntüleri.	24
Şekil 4.5. PSMP (3mg/mL), yağlı süt ve yağlı süt ile etkileştirilmiş PSMP (3mg/mL) örneklerinin DLS spektrumları.....	25
Şekil 4.6. PSMP (3mg/mL), yağsız süt ve yağsız süt ile etkileştirilmiş PSMP (3mg/mL) örneklerinin DLS spektrumları.....	25
Şekil 4.7. Yağlı süt örneği ile etkileştirilen farklı konsantrasyonlardaki PSMP'lere ait floresans intensiteleri. Farklı harfler p<0.05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir.	28
Şekil 4.8. Yağsız süt ile etkileştirilen farklı konsantrasyonlardaki PSMP'lerin floresans intensiteleri. Farklı harfler p<0.05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak farkı göstermektedir.	28
Şekil 4.9. Yağlı süt ile etkileşen PSMP'lerin SDS-PAGE elektroforegramı. 1:Belirteç; 2: 66 kat seyreltilmiş Yağlı süt örneği; 3: Yağlı süt örneği (pellet); 4: Yağlı süt örneği + 0.25 mg/mL PSMP; 5: Yağlı süt örneği + 1 mg/mL PSMP; 6: Yağlı süt örneği + 3 mg/mL PSMP.....	30
Şekil 4.10. Yağsız süt ile etkileşen PSMP'lerin SDS-PAGE elektroforegramı. 1:Belirteç; 2: 66 kat seyreltilmiş Yağsız süt örneği; 3: Yağsız Süt Örneği (pellet); 4: Yağsız süt örneği + 0.25 mg/mL PSMP; 5: Yağsız süt örneği + 1 mg/mL PSMP; 6: Yağsız süt örneği + 3 mg/mL PSMP.	31
Şekil 4.11. Sindirim simülasyonunun SSF aşaması sonrası A) d-PSMP, B) yağlı süt ortamında d-PSMP ve C) yağsız süt ortamında d-PSMP'lere ait 1000x büyütme değeri (üsteki) ve 40000x büyütme değerindeki (alttaki) ESEM görüntüleri.	33

Şekil 4.12. Sindirim simülasyonunun SSF aşaması sonrası A) d-PSMP ve B) yağsız süt ortamındaki d-PSMP'lere ait TEM görüntüleri.	33
Şekil 4.13. Sindirim simülasyonunun SGF aşaması sonrası A) d-PSMP, B) yağlı süt ortamında d-PSMP ve C) yağsız süt ortamında d-PSMP'lere ait 1000x büyütme değeri (üstteki) ve 40000x büyütme değerindeki (alttaki) ESEM görüntüleri.	35
Şekil 4.14. Sindirim simülasyonunun SGF aşaması sonrası A) d-PSMP ve B) yağsız süt ortamındaki d-PSMP'lere ait TEM görüntüleri.	35
Şekil 4.15. Sindirim simülasyonunun SIF aşaması sonrası A) d-PSMP, B) yağlı süt ortamında d-PSMP ve C) yağsız süt ortamında d-PSMP'lere ait 1000x büyütme değeri (üstteki) ve 40000x büyütme değerindeki (alttaki) ESEM görüntüleri.	36
Şekil 4.16. Sindirim simülasyonunun SIF aşaması sonrası A) d-PSMP ve B) yağsız süt ortamındaki d-PSMP'lere ait TEM görüntüleri.	37
Şekil 4.17. Sindirim simülasyonu sonunda elde edilen yağlı süt ve yağsız süt ile inkübe edilmiş d-PSMP, d-PSMP, PSMP (3 mg/mL) örneklerinin DLS spektrumu.	39
Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlardaki d-PSMP örneklerinin her bir sindirim sıvısından sonra alınan pelletlerin normalize floresans intensiteleri gösterilmiştir. Farklı büyük harfler SSF, küçük harfler SGF ve *'lı harfler SIF içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p<0.05$)	41
Şekil 4.18. Yağlı süt ile inkübe edilmiş farklı konsantrasyonlardaki d-PSMP örneklerinin her bir sindirim sıvısından sonra alınan pelletlerin normalize floresans intensiteleri gösterilmiştir. Farklı büyük harfler SSF, küçük harfler SGF ve *'lı harfler SIF içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p<0.05$)	41
Şekil 4.19. Yağsız süt ile inkübe edilmiş farklı konsantrasyonlardaki d-PSMP örneklerinin her bir sindirim sıvısından sonra alınan pelletlerin normalize floresans intensiteleri gösterilmiştir. Farklı büyük harfler SSF, küçük harfler SGF ve *'lı harfler SIF içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p<0.05$)	42
Şekil 4.20. Sindirim simülasyonunda SSF ile muamele sonrası süt örnekleri, d-PSMP ve süt örnekleri ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerine ait elektroforegramı.	

- 1:Belirteç; 2:SSF; 3: SSF + d-PSMP; 4: SSF + yağsız süt etkileştirilmiş d-PSMP 5: SSF + yağlı süt ile etkileştirilmiş PSMP; 6: SSF + 10 kat seyreltilmiş yağsız süt ; 7: SSF + 10 kat seyreltilmiş yağlı süt 43
- Şekil 4.21. Sindirim simülasyonunda SGF ile muamele sonrası süt örnekleri, d-PSMP ve süt örnekleri ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerine ait elektroforegramı. 1:Belirteç; 2:SGF; 3: SGF + d-PSMP; 4: SGF + yağsız süt ile etkileştirilmiş d-PSMP 5: SGF + yağlı süt ile etkileştirilmiş d-PSMP; 6: SGF + 10 kat seyreltilmiş yağsız süt; 7: SGF + 10 kat seyreltilmiş yağlı süt..... 44
- Şekil 4.22. Sindirim simülasyonunda SIF ile muamele sonrası süt örnekleri, d-PSMP ve süt örnekleri ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerine ait elektroforegramı. 1: Belirteç; 2:SIF; 3: SIF + d-PSMP; 4: SIF + yağsız süt etkileştirilmiş d-PSMP 5: SIF + yağlı süt ile etkileştirilmiş d-PSMP; 6: SIF + 10 kat seyreltilmiş yağsız süt; 7: SIF + 10 kat seyreltilmiş yağlı süt..... 45
- Şekil 4.23. PSMP ve yağlı ve yağsız süt ile etkileştirilmiş PSMP'lerin kendi kontrollerine göre % hücre canlılığı. * kendi grubundaki diğer örneklerden anlamlı olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0.05$)..... 48
- Şekil 4.24. d-PSMP ve yağlı ve yağsız süt ile etkileştirilmiş d-PSMP'lerin kendi kontrollerine göre % hücre canlılığını göstermektedir. Örnekler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p<0.05$) 48
- Şekil 4.25. PSMP ve yağlı ve yağsız süt örnekleri ile inkübe edilmiş PSMP'lerin kontrollerine göre %ROS değerleri. Kendi grubundaki örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p<0.05$). 49
- Şekil 4.26. d-PSMP ve yağlı ve yağsız süt örnekleri ile inkübe edilmiş d-PSMP'lerin kontrollerine göre %ROS değerleri. Kendi grubundaki örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p<0.05$). 50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Modifiye edilmiş <i>in-vitro</i> simüle sindirim sıvılarının içerikleri [101].	12
Çizelge 3.2. SDS-PAGE analizinde kullanılmış olan elektroforezi tamponunun içeriği	15
Çizelge 3.3. SDS-PAGE analizinde kullanılmış olan ayırma ve yükleme jeli içerikleri	15
Çizelge 3.4. SDS-PAGE analizi için kullanılan örnek yükleme tamponu içeriği	16
Çizelge 3.5. SDS-PAGE analizi için kullanılan jel boyama çözeltisi	16
Çizelge 3.6. SDS-PAGE analizi için kullanılan jel yıkama çözeltisi	16
Çizelge 4.1. Tez kapsamında kullanılan yağlı ve yağsız sütlerin kompozisyonu.....	20
Çizelge 4.2. Yağsız süt, yağlı süt, PSMP (3 mg/mL) ve süt örnekleri ile inkübe edilmiş PSMP'lere (3mg/mL) ait ortalama hidrodinamik çap ve ζ -potansiyel değerleri. Farklı büyük harfler ζ -potansiyelinde, farklı küçük harfler ise hidrodinamik çapta anlamlı düzeyde fark olduğunu göstermektedir (p<0.05).	26
Çizelge 4.3. Sindirim simülasyonu sonunda alınan d-PSMP ve yağlı ve yağsız süt ile etkileştirilmiş d-PSMP'lerin ortalama çap, PDI ve ζ -potansiyel (mV) değerleri. Farklı büyük harfler ζ -potansiyelinde, farklı küçük harfler ise hidrodinamik çapta anlamlı düzeyde fark olduğunu göstermektedir (p<0.05).	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ζ	Zeta
α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro
κ	Kappa
°C	Santigrat derece
h:h	Hacim/hacim

Kısaltmalar

MP	Mikroplastik
NP	Nanoplastik
PSMP	Polistiren Mikroplastik
d-PSMP	Sindirim simülasyonu uygulanmış PSMP
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
UV	Morötesi
BSA	Sığır Serum Albümini
HSA	İnsan Serum Albümini
FBS	Fetal Sığır Serumu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
ESEM	Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
TRPS	Ayarlanabilir Dirençli Darbe Algılama
CD	Dairesel Dikroizm
ITC	İzotermal Titrasyon Kalorimetresi
SSF	Simüle Tükürük Sıvısı
SGF	Simüle Mide Sıvısı
SIF	Simüle Bağırsak Sıvısı

DCFH-DA	2',7' -diklorodihidrofloresin diasetat
MTT	3-(4,5-dimetil-tiyazolil)2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
DTT	Ditiyotreitöl
PBS	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
CO ₂	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
RIPA	Radyo-immunopresipitasyon Deney Tamponu
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
HBSS	Hank's Balanced Tuz Çözeltisi
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
APS	Amonyum Persülfat
TEMED	Tetrametiletildiamin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi
CAT	Katalaz
SOD	Superoksit Dismutaz

1. GİRİŞ

Plastik üretimi son yıllarda artarak katlanmıştır. Plastik üretimi 2019 yılında Avrupa’da 57.9 milyon tona, dünyada ise 368 milyon tona ulaşmıştır. Plastik polimerlerinin paketleme, tarım, günlük ihtiyaçlar gibi birçok kullanım alanı mevcuttur. Avrupa’da en çok kullanılan plastik polimerleri arasında polipropilen (PP), polietilen (PE), polivinil klorür (PVC), poliüretan (PU) ve polistiren (PS) gelmektedir. Plastik paketleme Avrupa’da plastik arzının %40.5’ini kaplamaktadır [1]. Bu plastik atıklarının doğada bulunması küresel bir tehlikedir [2, 3]. Plastik parçacıklar arasında, boyutu 5 mm’den küçük olanlar mikroplastik (MP) [4-6] ve 1000 nm’den düşük olanlar nanoplastik (NP) [7] olarak tanımlanmaktadır. Mikroplastikler basitçe iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar, birincil ve ikincil kaynaklı mikroplastiklerdir. Birincil mikroplastikler endüstriyel veya evsel atıklar vb. yollarla çevreye bulaşan mikroplastiklerdir. İkincil mikroplastikler ise büyük plastik atıklarından parçalanarak mikroplastikleri ifade etmektedir [4, 5]. Bu büyük plastikler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik yollarla parçalanarak mikroplastikleri oluşturmaktadır [8, 9]. Ayrıca, mikroplastik atıkları daha ileri düzeyde parçalanma ile nanoplastikleri oluşturabilmektedir [9, 10]. Günümüzde, mikroplastikler doğada her yerde bulunmaktadır. Bu zamana kadar mikroplastik kirliliği atmosferimizde [11], okyanuslarda [12], göllerde [13-15], tarımsal topraklarda [16, 17], ve hatta midye [18], konserve balık [19, 20], tuz [21, 22], paketlenmiş et ürünleri [23] ve şişelenmiş sular [24] gibi yiyecek ve içeceklerde tespit edilmiştir.

Mikroplastiklerin gıdalarda bulunmasından dolayı, diyet yolu ile tüketilebilmekte ve bu durum insan sağlığına tehdit oluşturmaktadır. Bunun sonucunda mikroplastiklerin, karaciğerde metabolizma bozukluklarına [25], inflamasyona [26], organlarda birikime [26-31], bağırsak florasında bozulmalara [32], bağırsak geçirgenliğinin artmasına [33], sitotoksositeye [34, 35] neden oldukları gözlemlenmektedir. Ayrıca mikroplastiklerin hücrel reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species-ROS) meydana getirdiği rapor edilmiştir [30, 36]. Bunların yanı sıra, bazı *in-vitro* çalışmalarda polistiren mikroplastiklerin (PSMP), Caco-2 hücrelerinde hücrel ROS’unu indüklediği [37] ve BEAS-2B hücrelerinde ROS’unu indükleyerek akciğer epitel hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu gösterilmiş [34]. Partiküller protein içeren biyolojik çözeltilerle temas ettiklerinde, çözeltideki proteinler partikül yüzeyini veya bir kısmını kaplayabilmekte ve

böylece partikül yüzeyinde “protein korona” adı verilen yapı oluşmaktadır. Partiküllerdeki protein korona yapısı partikülün biyo-uyumluluğunu arttırarak, yüzey serbest enerjisini azaltarak sitotoksitesini azaltabilmekte veya proteinlerin yapısal değişikliklerine, lizozomal hasara neden olarak sitotoksitesiyi artırabilmektedir [38]. Plastik partiküllerin bugüne kadar pek çok protein ve organik bileşen ile korona yapısı oluşturduğu literatürde gösterilmiştir [39-43]. Gıdalarla birlikte tüketilen mikroplastiklerde de korona yapısının varlığı kaçınılmaz görünse de gıda matrisi ve plastik partiküller arasındaki etkileşimin ve oluşan korona yapısının incelendiği ve gıdalarla birlikte tüketilen mikroplastiklerin toksik özelliklerindeki değişimin araştırıldığı çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, düşük mikron çapındaki PSMP, gerçek bir gıda ortamı olarak seçilen süt ile etkileşiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Süt içerisindeki mikroplastiklerin protein korona yapısı araştırılmıştır. Ayrıca mikroplastiklerin gıda ortamındayken, sindirim simülasyonu sonucu yapılarında meydana gelen değişimler incelenmiştir. Son olarak, sindirim simülasyonu sonucu bu plastiklerin *in-vitro* toksisitelerinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında ilk defa bir mikro plastiğin gerçek gıda ortamındaki değişimi ve bu değişimin *in-vitro* sindirim simülasyonu ile beraber toksisitesi üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroplastikler

Büyük sentetik moleküller, monomer olarak adlandırılan küçük molekül birimlerinin bir araya getirilmesiyle oluşur. Bu moleküllerin birleşmesine polimerizasyon denir ve büyük moleküldeki bu küçük moleküllerin sayısı polimerizasyon derecesi olarak da adlandırılmaktadır [44, 45]. Plastikler liflerden, kauçuklardan ve diğer polimerlerden farklı özellikleri olan özel bir polimer grubudur [46]. Plastikler petrol veya gazların ekstraksiyonundan elde edilen monomerlerin polimerizasyonu sonucu elde edilen sentetik organik polimerlerdir. Plastiklerin seri üretimi 1940'larda başladığından beri üretimi hızla artmış ve 2019 yılında 368 milyon tona kadar ulaşmıştır [1, 47]. Plastikler klasik anlamda kristalleşmemekte, bitişik zincirlerin bölümleri amorf fazla çevrili küçük kristal faz oluşturmaktadırlar [48]. Plastiklerin üç farklı termal geçişleri vardır. Bunlar; (i) camsı geçiş sıcaklığı, (ii) kristal erime sıcaklığı ve (iii) kristalleşme sıcaklığıdır. Bütün polimerlerin camsı geçiş sıcaklığı varken sadece yarı-kristalize polimerlerin erime ve kristalleşme sıcaklığı vardır. Camsı geçiş sıcaklığı ısıtma sırasında polimer zincirlerinin amorf fazdan hareketli faza geçtiği bir sıcaklık aralığıdır [49]. Camsı geçiş sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda polimer cam gibi sert ve katı formda olduğundan dolayı camsı formda [44, 49], camsı geçiş sıcaklığı ile erime sıcaklığının arasında lastik benzeri bir formda ve erime sıcaklığının üstünde akışkan olup viskoz formdadır [50]. Plastikler termoset ve termoplastik olarak ikiye ayrılmaktadır. Termoplastikler doğrusal veya az dallanmış zincirlerden oluşmaktadır. Bu zincirler sıcaklık ve basınç ile birbiri üzerinden kayabilmektedir. Bu yüzden termoplastikler, yüksek sıcaklıklarda akışkan hale gelerek ürünün oluşmasını sağlamaktadır. Ancak aynı nedenden dolayı ısıtıldıklarında veya kesildiklerinde şekilleri değişebilmektedir. Termoset plastikler ise ısıtıldıklarında akışkan hale gelmemektedir. Bunun yerine, yüksek sıcaklıklarda kömürleşme meydana gelmektedir. Termoplastiklerin her bir polimer zinciri birbirine zayıf van der Waals kuvvetleri ile bağlıdır [44]. Ancak termosetlerde polimer zincirleri birbirlerine kimyasal çapraz bağlarla bağlıdır [44, 51]. Termoplastikler şekil değiştirme işlemine tekrardan maruz kalabilirken, termoset plastikler bahsedilen kovalent bağlardan dolayı sertleşme işleminden sonra tekrardan eriyip akışkan hale gelemezler [46].

Polistiren stiren monomerlerinin polimerizasyonu ile oluşan, yarı saydam, dayanıklı ve kolaylıkla boyanabilen bir termoplastik polimerdir. Stiren ise etilen ve benzenden üretilmektedir [52]. Polistiren transparan sert ve kırılğan olan bir termoplastiktir [53]. Polistiren genel olarak tek kullanımlık yemek kapları, kupalarda ve yemek takımlarında, yoğurt, krema, tereyağı ambalajlarında, termal yalıtım malzemesi vb. birçok yerde kullanılmaktadır [54, 55].

Mikroplastikler (MP) 5 milimetrenin altında çapa sahip olan plastik partiküller olarak tanımlanmaktadır [4-6], ancak bazı kaynaklar 1-5 milimetre arası MP olarak 1µm-1mm arasındaki plastikleri de mini MP olarak tanımlamaktadır [56]. MP basitçe iki gruba ayrılabilir. Bunlar birincil mikroplastikler ve ikincil mikroplastiklerdir. Birincil mikroplastikler, üretim esnasında mikron boyutta üretilen, küresel şekilde olan [56] ve genellikle yüz kremleri ve kozmetik sektöründe kullanılmaktadır. Bu birincil mikroplastikler evsel veya endüstriyel atık sistemleri ile çevreye salınabilmektedir [47, 57]. İkincil mikroplastikler, daha büyük plastik atıklarının bozunması ile meydana gelen mikroplastiklerdir. Bu bozunmalara, genellikle mikroorganizmaların neden olduğu biyobozunma, ışığın neden olduğu fotobozunma, ortalama sıcaklıklarda yavaş oksitlenmenin neden olduğu termo-oksidatif bozunma, yüksek sıcaklıkların neden olduğu termal bozunma (çevresel bozunma mekanizması değil) ve su ile reaksiyonun neden olduğu hidroliz örnek olarak verilebilmektedir [9, 47, 57].

Plastiklerin biyobozunması biyolojik organizmalar ile plastiklerin bozunmasını ifade etmektedir. Biyobozunma iki aşamalı olarak gerçekleşmektedir. Birinci aşamada uzun polimer zincirlerinin karbon-karbon bağları, oksijen, nem, ısı, ultraviyole ışınları veya mikrobiyal enzimler tarafından kırılarak daha küçük zincirler oluşmaktadır. İkinci aşamada polimer hücre duvarından geçebilecek kadar küçük parçalara ayrıldığı zaman başlamaktadır. Bu durumda küçük zincirlerdeki karbon enerji kaynağı olarak mikrobiyal organizmalar tarafından kullanılmaktadır [53].

Termal bozunma ortam sıcaklığının yükselmesi ile iç enerjinin artarak plastik malzemenin parçalanması anlamına gelmektedir. Termal bozunma temel olarak üç aşamada gerçekleşir. Bunlar başlangıç aşaması, yayılma aşaması ve bozunmanın sonlanma aşamasıdır. Başlangıç aşamasında iç enerjinin artmasıyla uzun polimer zincirlerinden serbest radikallerin oluşumu gerçekleşmektedir [53, 58]. Bir sonraki aşamada, önceki aşamada oluşan serbest radikaller atmosferdeki oksijen ile reaksiyona

girerek peroksit radikallerini oluşturmaktadır. Oluşan bu radikallerde daha sonra ayrılarak hidroksil ve alkoksi radikallerini oluşturmaktadır. Bu radikaller de tekrardan atmosferdeki oksijenle serbest radikalleri oluşturmakta ve zincirleme reaksiyon ilerlemektedir. En son aşamada yeterli oksijen veya enerji kalmayınca reaksiyon sonlanmaktadır. Bunun dışında radikaller birbiri ile reaksiyona girerek kararlı bileşikler oluşturarak da reaksiyon sonlanabilmektedir [53].

Foto bozunma plastik materyalin ışık enerjisini absorblaması ile parçalanmasını ifade etmektedir. Birçok plastik kromofor olarak adlandırılan fotoreaktif grupları (örneğin polistirendeki stiren) içermektedir [53, 58]. Bu fotoreaktif gruplar UV ışığı absorblayarak kimyasal bağların parçalanmasını sağlamaktadır. Plastik malzemelerin foto-oksidasyonu genellikle UV ışığın UV-B bölgesinde bulunan (315-280 nm) ışınlar tarafından gerçekleşmektedir. Bu ışınlar serbest radikal polimer zincir reaksiyonu ile parçalanma reaksiyonunu tetiklemektedir [53]. Bu bozunmaların dışında hidrolitik bozunma denizlerde önemli bir parçalanma mekanizması değildir. Bu bozunmalar arasında ışık ile indüklenen foto-oksidasyon dışındaki bozunmalar daha yavaş gerçekleşmektedir [9]. Mikroplastiklerin dünya çapında yayıldığı kabul edilmektedir [59]. Bugüne kadar mikroplastiklere atmosfer [11], okyanuslar [12], göller [13-15], tarımsal araziler [16, 17] gibi birçok yerde rastlanmıştır. Ayrıca mikroplastikler doğal alanlar dışında tuz [21, 22], konserve balık [19, 20], midye [18], paketlenmiş etler [23], şişelenmiş sular [24] gibi yiyecek ve içeceklerde de tespit edilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalar mikroplastiklerin su şişelerinden [60], hazır yiyecek kaplarından [61, 62] ve plastik çay torbalarından [63] salınabileceğini göstermiştir.

2.2. Protein Korona

Nano veya düşük mikron skalasındaki bir partikül biyolojik bir sıvıda bekletildiği zaman, biyomoleküller partikülün yüzeyi ile fiziksel veya kimyasal etkileşime geçmektedir [64-67]. Bu etkileşimi gösteren proteinler “protein korona” adı verilen yapıyı oluşturmaktadır [64-66]. Protein korona yapısı bazen partikülün etrafını tamamen sararak bir protein katmanı oluşturup partikülü maskeleyebilmektedir [64]. Proteinler diğer moleküllerle birçok etkileşimde bulunabilmektedirler. Bunlar, yüzeylerindeki yükler sayesinde gerçekleşen elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, diğer moleküllerle kurdukları kovalent bağlar, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik-hidrofilik etkileşimlerdir [67]. Patil ve ark., [68] partiküller ile proteinler arasındaki etkileşimin sadece elektrostatik

olmadığını, ayrıca Van der Waals, hidrofobik-hidrofilik, yapısal ve sterik etkilerinde olabileceğini göstermişlerdir.

Protein korona yapısı iki kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar sıkı protein korona ve gevşek protein koronadır [69]. Sıkı protein korona türünde, yapı çok kısa sürede oluşmakta, biyomoleküller partikül yüzeyine sabit bir şekilde bağlanmakta ve yüksek afinite göstermektedir. Gevşek protein korona türünde ise, biyomoleküller partikül yüzeyi ve ortam arasında dinamik bir şekilde değişim göstermekte, partiküle düşük afinite göstermekte, zayıf bir şekilde bağlanmakta ve yapı saatlere varan sürelerde oluşmaktadır [65, 70].

Literatürde plastik partiküllerin sindirim sıvılarındaki organik bileşenler [41] ve sindirim enzimleri [42], hümkik asit [40], insan serum albümini (HSA) [39, 71], lizozim [39], sığır serum albümini (BSA) [43, 72] ve sığır tripsini [72] ile protein korona yapısı oluşturduğu belirtilmiştir. Stock ve ark. [41] yaptığı çalışmada farklı mikroplastikler üzerine *in-vitro* sindirim uygulamış sindirim sıvılarının mikroplastiklerin şeklini deforme etmediğini göstermiştir. Ayrıca mikroplastiklerin (özellikle polistirenin) çevresinde protein korona yapısı oluştuğunu ve boyutlarının arttığını belirtmiştir. Wang ve ark. [42] yaptığı çalışmada, polistiren nanopartiküllerinin pepsin, α -amilaz ve tripsin sindirim enzimleri ile etkileşimlerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda enzimler ile partiküller arasında etkileşim olduğu, etkileşim sonrası partiküllerin etrafında protein korona yapısı oluştuğunu, partiküllerin ζ -potansiyelinin arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca etkileşimin esas olarak hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri tarafından yönlendirildiğini belirtmişlerdir. Oluşan bu protein korona yapısı partiküllerin özelliklerini maskeleyebilmekte [66], stabilitesini [73] ve toksisitesini [74] değiştirebilmektedir. Partiküllerin etrafındaki protein korona lizozomal hasara, protein yapısının değişimine neden olarak sitotoksiteyi artırabilmekte veya yüzey serbest enerjisini azaltarak, biyoyumluluğu artırarak veya partikülün hücre ile direkt etkileşimini azaltarak sitotoksiteyi azaltabilmektedir [38]. Bu nedenle, mikroplastiklerin karakteristik özellikleri incelenirken buldukları ortama göre oluşabilen protein korona yapılarının da incelenmesi önemlidir.

Protein korona yapısının incelenmesinde direkt veya dolaylı yöntemler kullanılmaktadır. Direkt yöntemler doğrudan proteinlerin incelenmesine dayanırken, dolaylı yöntemlerde partikülün özelliklerindeki değişim incelenmektedir. Protein korona oluşumunun partikül

büyüklüğü ve partikülün yüzey yüküne etkisini göstermek için diferansiyel ışık saçılım spektrometresi (differential light scattering-DLS) [75, 76] ve ayarlanabilir dirençli darbe algılama (tunable resistive pulse sensing-TRPS) [77], partikülün yüzey morfolojisinin ve büyüklüğünün incelenmesi amacıyla geçirimli elektron mikroskobu (transmission electron microscope-TEM) [75, 76] ve taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope SEM) [78] ve korona yapısının partiküle gösterdiği afiniteyi ölçmek amacıyla izotermal titrasyon kalorimetresi (isothermal titration calorimetry-ITC) [79, 80] analizleri kullanılmaktadır. Protein koronada bulunan proteinlerin korona oluşumu sonrası yapısal değişikliklerini incelemek amacıyla dairesel dikroizm (circular dichroism-CD) spektroskopisi [81, 82] analizi kullanılmaktadır. UV-Vis spektroskopisi veya floresans ajanlar kullanılarak floresans spektroskopisi gibi analizler de partikül protein etkileşiminin incelenmesinde başka bir yol olarak kullanılmaktadır [83]. Oluşan protein koronadaki proteinlerin tanımlanması için elektroforez analizi ve ardından çeşitli kütle spektroskopileri kullanılmaktadır [83, 84]. Bu yöntemlerin bazıları *in-situ* çalışmaya uygunken, bazı analizlerde korona yapısına sahip partiküllerin ortamdaki serbest proteinlerden ayrılması gerekmektedir. Bu tür *ex-situ* çalışmalarda, çoğunlukla gevşek korona yapısı ortamdaki uzaklaştırılmakta ve sıkı korona yapısı incelenmektedir [83].

2.3. Toksikolojik Çalışmalar

İnsanlar mikroplastiklere, yiyecek ve içeceklerle tüketim yoluyla, atmosferden bulunan serbest mikroplastikleri soluyarak veya su ve kozmetik ürünleri ile dermal yolla maruz kalmaktadır [85-87]. Bu maruziyet ilk olarak maruz kaldığı organların epitel tabakalarında gerçekleşmektedir [87]. 2014 yılında yapılan bir araştırmada Avrupa'da kabuklu deniz ürünleri ile tüketilen mikroplastik miktarının ortalama kişi başı yıllık 11000 partikül olduğu düşünülmektedir [88]. Dermal yol ile alınan mikroplastiklerin muhtemel vücuda giriş yolları saç kökleri, ter bezleri veya yaralı cilttir [89]. Ancak partiküllerin dermal yol ile alınması için 100 nm altındaki partiküllerin geçebildiği striatum corneum tabakasını geçmeleri gerekmektedir. Bu yüzden mikro plastiklerin dermal yol ile alımı pek olası değildir [86].

Mikroplastiklerin maruziyet sonrası toksisitesinin belirlenmesi amacıyla birçok *in-vivo* ve *in-vitro* toksisite çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda mikroplastiklerin, karaciğer de metabolizma bozukluklarına [25], inflamasyona [26], organlarda birikime [26-29], bağırsak florasında bozulmalara [32], bağırsak geçirgenliğinin artmasına [33],

oksidatif stresin artmasına [90, 91], sitotoksositeye [34, 35] neden oldukları gözlemlenmektedir. Mikroplastiklerin ana maruziyet yollarından birinin oral yol olduğu düşünülmektedir. Bu yol ile alınan mikroplastikler ilk olarak sindirim sistemine zarar vermektedir. Mikroplastikler sindirim sisteminde daha çok bağırsak florasının bozulmasına, karaciğerde yağ asidi metabolizmasının bozulmasına ve oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır [92]. Li ve ark. [32] 2020 yılında yaptığı bir çalışmada, C57BL/6 farelerin besinlerine polietilen mikroplastikler eklenerek bağırsak mikrobiyotasındaki değişimler ve inflamasyon gelişimi gözlemlenmiştir. Mikroplastikler ile beslenen grupların bağırsak mikroflorasında *Staphylococcus* türlerinde artış, *Parabacteroides* türlerinde azalış görüldüğü belirtilmiştir. Aynı zamanda plastik ile beslenen grupların, serum interlökin-1 α seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve inflamasyonu indüklediği belirtilmiştir. Qiao ve ark. [33] zebra balıkları üzerinde yaptığı bir çalışmada, farklı şekillerdeki mikroplastiklerin varlığında, canlıların bağırsak mikrobiyotasında değişim olduğu, inflamasyon oluştuğu, mukozal hasarın olduğu ve geçirgenliğin arttığı rapor edilmiştir. Bağırsak mikroflorasında, bağırsak inflamasyonunda rolü olan *Proteobacteria*'ların arttığını belirtmişlerdir. Feng ve ark. [93] yaptığı çalışmada, *Oryzias melastigma* türü balıklar oral yol ile 2 ve 200 μ m boyutunda polistiren mikroplastiklere maruz bırakılmış ve 28 gün sonunda canlıların ağırlıklarının azaldığını, hücre reaktif oksijen türlerinin azalmasında rol alan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin aktivitelerinin arttığını, endokrin ve glikolipid metabolizmalarının bozulduğunu belirtmişlerdir.

Mikroplastik partiküllerin polimer tehlike sınıflandırmasına göre en zararlıları, poliüretanlar, poliakrilonitriller, polivinil klorürler, epoksi resinleri ve stirenik kopolimerlerdir [94]. Ayrıca partiküllerin sitotoksitesini partikül boyutu, dozaj, yüzey yükü, katkıları, kronik maruziyet, adsorblanan kirlilikler, ağır metaller ve patojenler gibi çeşitli faktörler etkileyebilmektedir [95]. Ayrıca literatürde partiküllerin etrafındaki protein korona yapısının, partikülün biyo-uyumluluğunu arttırarak ve yüzey serbest enerjisini azaltarak sitotoksitesini azaltabileceği belirtilmiştir. Diğer yandan, oluşan protein koronanın proteinlerin yapısal değişikliklerine yol açabileceği ve lizozomal hasara neden olarak sitotoksiteyi artırabileceği de belirtilmiştir [38]. Bertoli ve ark. [96] A549 hücreleri ve farklı yüzey modifikasyonlarına sahip polistiren mikroplastikleri ile yaptıkları çalışmada, amin modifiye polistiren mikroplastiklerinin fetal sığır serumu ile oluşturdukları protein korona yapısının hücre içine alınıp, lizozoma kadar bozulmadan

geldiğini göstermişlerdir. Lizozoma giren korona yapısının lizozom içinde bozulduğu ve kalıntılarının 16 saat boyunca sitoplazmada bulunduğunu göstermişlerdir. Liu ve ark. [74] yaptıkları çalışmada ise *in-vitro* sindirim simülasyonu uygulanan polistiren mikroplastiklerinin etrafında korona yapısı oluştuğu gösterilmiştir. Ardından bu korona yapısı oluşan polistiren mikroplastiklerin Caco-2 hücreleri üzerinde, korona yapısı olmayan polistiren mikroplastiklere göre daha az sitotoksosite oluşturduğu gösterilmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda kullanılan partikül büyüklükleri geniş bir aralıktadır. Mikroplastiklerde, partikül boyutu küçüldükçe toksisitenin arttığı gözlemlenmekle birlikte [92], bu durum toksisite çalışmasının yürütüldüğü hücre tipine, partikülün yüzey yüküne, maruz kalma süresine, dozuna ve bulunduğu ortama göre partikülün yüzeyinde oluşan korona yapısına göre değişebilmektedir [95]. Bu nedenle, gıdalarda, özellikle son yıllarda, önemli bir bulaşan haline gelen mikroplastiklerin karakteristik özelliklerinin ve toksisitelerinin belirlenmesinde gıda modellerinin veya gerçek gıda örneklerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan yağlı ve yağsız ısıl işlem görmüş sütler yerel marketten temin edilmiştir. Polistiren mikro plastiği (PSMP) tezin desteklendiği Uluslararası-2558 NSTDA-TÜBİTAK ikili iş birliği projesindeki proje ortağı NANOTEC (NSTDA, Tayland) grubu tarafından sentezlenip hediye edilmiştir. Floreskamin, hidroklorik asit, Tris, gliserol, pepsin, α -amilaz, pankreatin, lipaz, sığır serum albümini (BSA), üre, ürik asit, D-glukoz, glukuronik asit, D-glukozamin hidroklorür, safra, NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃, NH₄Cl, NaH₂PO₄, KSCN, Na₂SO₄, MgCl₂, KH₂PO₄, NaHCO₃, ditiotreitol (DTT), metanol, asetik asit, high glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal sığır serumu (fetal bovine serum-FBS), penisilin, streptomisin, L-glutamin, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), 3-(4,5-dimetil-tiyazolil)2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), dimetil sülfoksit (DMSO), 2',7'-diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA), Hank's buffered tuz çözeltisi (Hank's buffered salt solution-HBSS), radyo-immünopresipitasyon deney tamponu (RIPA) Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat (APS), akrilamid, bisakrilamid, tetrametiletilediamin (TEMED), Coomassie brilliant blue G-250 Bio-Rad (Watford, Birleşik Krallık) firmasından temin edilmiştir. Caco-2 (An 1) kolon hücreleri Şap Enstitüsü'nden (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Süt Kompozisyonunun Belirlenmesi

Süt örneklerinin protein miktarı Bradford yöntemi [97], yağ yüzdesi gerber metodu [98], yoğunluğu laktodansimetre metoduyla, kuru maddesi gravimetrik yöntem ile belirlenmiştir [99]. Süt örneklerinin kuru maddesi gravimetrik yöntem ile ölçülmüştür. Bu amaçla cam petri kapları 100 °C etüvde sabit ağırlığa gelinceye kadar bekletilmiştir. Daha sonra süt örneklerinden 5 mL cam petri kaplarına alınıp tartılmıştır. Örnekler ilk önce etüv içinde 1 saat içinde 70 °C'den 102 °C'ye kademeli olarak getirilmiş. Örnekler sabit tartıma gelinceye kadar etüvde bırakılmıştır. Tartımlar için etüvden çıkarılan örnekler nem çekici bulunduran desikatöre alınmış soğutulup tartılmıştır. Süt örneklerinin yoğunluğunun ölçülmesi amacı ile oda sıcaklığına getirilen süt örnekleri mezüre köpük

oluşturmayacak şekilde yavaşça yaklaşık 45° açıyla dökülmüştür. Daha sonra 20 °C'lik laktodansimetre sütün içine yavaşça bırakılarak batırılmıştır. Sabit noktada kaldığı yerde okuma yapılmıştır. Okuma sonrası sütün sıcaklığına göre laktodansimetre düzeltilmesi yapılmıştır. Süt örneklerinin pH'sı pHenomenal pH 1100L cihazına (VWR International, Radnor, PA, A.B.D.) bağlı ST210 pH probu (OHAUS, Parsippany, NJ, A.B.D.) ile ölçülmüştür. Kuru madde, yoğunluk ve pH testleri TS 1018 Çiğ içme sütü standardına [99], yağ analizi Gerber metodu ile TS 8189 standardına [98] göre yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında kullanılan yağlı ve yağsız süt örnekleri analizlerdeki girişimi azaltmak amacıyla amacı ile deiyonize su ile 10 kat seyreltilmiştir.

3.2.2. Partikül Karakterizasyonu ve Gıda Matrisi ve Partikül Etkileşimi

Gıda matrisi ve partikül etkileşimi için, yağlı ve yağsız süt örnekleri, son halinde partikül konsantrasyonu 0.25, 1 ve 3 mg/mL olacak şekilde PSMP'ler ile 1 saat boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. Ayrıca partikül karakterizasyonu için süt örnekleri ile etkileştirilmemiş PSMP'ler de analiz edilmiştir. *Ex-situ* analizler için inkübasyon sonrası PSMP-gıda kompleksinin, kalan ortamdaki ayrılması için 3000xg'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve saf su ile 3 defa yıkanmıştır. Analizlerde kontrol olarak ortamda PSMP olmayan süt örneklerinin pelletleri de alınmıştır. Yıkama sonrasında elde edilen pelletler başlangıç hacminde deiyonize suda çözdürülerek analizlerde kullanılmıştır.

3.2.3. Sindirim Simülasyonu

In-vitro sindirimin PSMP-protein korona yapısı üzerine etkilerini incelemek için gıda matrisi-partikül karışımı sindirim simülasyonuna tabi tutulmuştur. Bu amaçla, Minekus ve ark. [100] ve Sohal ve ark. [101] uyguladığı sindirim simülasyonu prosedürü bazı modifikasyonlar gerçekleştirilerek uygulanmıştır. Bu işleme başlamak için, simüle edilmiş tükürük sıvısı (SSF), simüle edilmiş mide sıvısı (SGF) ve simüle edilmiş bağırsak sıvısı (SIF) olmak üzere üç adet simülasyon sıvısı hazırlanmıştır. SIF simüle on iki parmak sıvısı ile simüle safra sıvısının hacimce 2:1 karıştırılması ile elde edilmiştir. Bu sıvıların içerikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Simülasyon sıvılarının hazırlanmasının ardından, yağlı ve yağsız süt örnekleri farklı konsantrasyonlardaki (0.25, 1 ve 3 mg/mL) PSMP'ler ile 25 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası gıda matrisi partikül karışımı yanında, tek başına PSMP ve süt örnekleri de SSF ile 1:1 (h:h) oranında karıştırılmış ve 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler bu halleriyle 1:1 (h:h) oranında SGF ile karıştırılmış ve 37°C'de 120 dakika inkübe edilmiştir. SGF ile

inkübasyon sonrası örnekler 1:1 (h:h) oranında SIF ile karıştırılmıştır ve 37°C'de 120 dakika inkübe edilmiştir. Her bir simülasyon sıvısından örnek alınıp 3 kere saf su ile yıkanmış ve yıkamalar arası 3000xg de 2 dk santrifüj uygulanmıştır. Elde edilen sindirilmiş PSMP (d-PSMP) ve süt örnekleri ile etkileştirilen d-PSMP örneklerinin pelletleri *ex-situ* analizler için kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Modifiye edilmiş *in-vitro* simüle sindirim sıvılarının içerikleri [101].

100 mL Simüle edilmiş tükürük sıvısı (SSF) pH 6.5 ± 0.1	100 mL Simüle edilmiş mide sıvısı (SGF) pH 1.4 ± 0.1	Simüle edilmiş bağırsak sıvısı (SIF)	
		100 mL Simüle on iki parmak sıvısı pH 8.1 ± 0.1	100 mL Simüle safra sıvısı pH 8 ± 0.1
20 mg Üre	8.5 mg Üre	10 mg Üre	25 mg Üre
89.6 mg KCl	65 mg D-Glukoz	5 mg MgCl ₂ •6H ₂ O	37.6 mg KCl
20 mg KSCB	2 mg Glukuronik asit	56.4 mg KCl	578.5 mg NaHCO ₃
102.2 mg NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	33 mg D-Glukozamin hidroklorür	8 mg KH ₂ PO ₄	525.9 mg NaCl
57 mg Na ₂ SO ₄	30.6 mg NH ₄ Cl	338.8 mg NaHCO ₃	600 mg safra
29.8 mg NaCl	40 mg CaCl ₂ •2H ₂ O	701.2 mg NaCl	180 mg BSA
1.6 mg ürik asit	82.4 mg KCl	300 mg Pankreatin	22.2 mg CaCl ₂ •2H ₂ O
14.5 mg α-amilaz	30.6 mg NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	50 mg Lipaz	
	100 mg BSA	100 mg BSA	
	100 mg Pepsin	20 mg CaCl ₂ •2H ₂ O	

3.2.4 Elektron Mikroskop Görüntüleri

PSMP, d-PSMP ve süt örnekleri ile etkileştirilmiş PSMP ve d-PSMP'lerin morfolojik özelliklerinin incelenmesi için çevresel taramalı elektron mikroskobu (environmental scanning electron microscope-ESEM) (FEI-Quanta 200 FEG, Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, A.B.D.) kullanılmıştır. Analiz öncesi, *ex-situ* olarak elde edilen örneklerden düzgün görüntü alabilmek için, örnekler deiyonize su ile 20 kat seyreltilip SEM stubları üzerinde kurutulmuştur. Ardından iletken bir yüzey sağlamak amacıyla kaplama cihazı (Precision Etching and Coating System 682, Gatan Inc., Pleasanton, CA, A.B.D.) kullanılarak örnekler 10 nm altın-paladyum kaplandıktan sonra görüntüler alınmıştır. Bütün görüntüler 4 spot genişliğinde, 20 kV'de elde edilmiştir.

Partiküllerin gıda ortamında yüzey özelliklerindeki değişimin görüntülenmesi amacıyla PSMP, d-PSMP ve süt örnekleri ile etkileştirilen PSMP ve d-PSMP örneklerinin geçirimli elektron mikroskobu (Transmission electron microscope-TEM) kullanılmıştır. Analizi gerçekleştirebilmek için, *ex-situ* alınan örnekler 20 kat seyreltikten sonra TEM ızgaralarına damlatılmış, ardından FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, A.B.D.) cihazı ile görüntüler alındı. TEM analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesinde (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2.5. Hidrodinamik Çap ve Zeta Potansiyel Ölçümü

PSMP, d-PSMP ve süt örnekleri ile etkileştirilmiş PSMP ve d-PSMP'lerin hidrodinamik çaplarında ve zeta potansiyellerinde (ζ -potansiyel) meydana gelen değişimin incelenmesi için Zetasizer Nano Zs (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, B.K.) cihazı kullanılmıştır. *Ex-situ* olarak elde edilen örnek pelletleri deiyonize suda çözdürülmüş ve kapiler kuvetlere her örnekten 700 μ L aktararak ölçüm alınmıştır. Cihaza bağlı Zetasizer programında (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, B.K.) verilerin alınabilmesi için polistiren materyal olarak, su ise çözücü olarak belirlenmiştir. Ölçümler 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Analiz üçer tekrarlı olarak yürütülmüştür. Tüm ζ -potansiyeli ölçümleri, partiküller polar çözücü içinde dağıldığı için Smoluchowski eşitliği kullanılarak alınmıştır.

3.2.6. Floresans İşaretleme ile Protein Tayini

Bu çalışmada, partiküllerin yüzeylerine adsorbladıkları proteinlerin miktarlarını belirlemek amacı ile proteinler floresan bir etiket ile işaretlenmiştir. Bu amaçla

kullanılan floreskamin, protein zincirindeki primer aminler ile etkileşime girip floresans ışına yapan florojenik bir boyadır [102]. Bu doğrultuda, gıda matrisi ile etkileşim sonrasında ortamdaki ayrılan partiküller, son partikül derişimleri, ilk derişimlerinden 7.5 kat fazla olacak şekilde deiyonize suda çözdürülmüştür. Daha sonra şeffaf tabanlı siyah mikropalakalara (Corning Incorporated, New York, NY, A.B.D.) 3:1 (h:h) oranında örnek ve floreskamin çözeltisi eklenip, plaka 1 dakika boyunca çalkalanmıştır. Çalkalama sonrasında örneklere ait floresans intensiteleri 365 nm uyarım ve 470 nm emisyon dalga boyunda Synergy-H1 Hibrid Mikropalaka Okuyucu (BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, A.B.D.) kullanılarak ölçülmüştür. Gıda matrisi ve partikül etkileşiminde bağlanma oranı partikülsüz süt örnekleri ile partiküllü süt örneklerinin floresans intensiteleri karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Sindirim simülasyonunda ise her bir sindirim sıvısından sonra alınan örneklerin floresans intensiteleri kendi içinde karşılaştırılmıştır. Analizler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. SDS-PAGE

Gıda matrisi ve partikül etkileşimi için, yağlı ve yağsız süt örnekleri, son halinde partikül konsantrasyonu 0.25, 1 ve 3 mg/mL olacak şekilde PSMP'ler ile 1 saat boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası PSMP-protein kompleksinin ortamda kalan serbest proteinlerden ayrılması için 2500xg'de 6 dakika santrifüj uygulanmış ve deiyonize su ile 3 defa yıkanmıştır. Sindirim simülasyonu örneklerinde ise yağlı ve yağsız süt ile 3 mg/mL konsantrasyonundaki PSMP'ler 25°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası gıda matrisi partikül karışımı yanında, tek başına PSMP ve süt örnekleri de SSF ile 1:1 (h:h) oranında karıştırılmış ve 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler ağız sindirimine uğrayan bu örnekler, 1:1 (h:h) oranında SGF ile karıştırılmış ve 37°C'de 120 dakika inkübe edilmiştir. SGF ile inkübasyon sonrası örnekler 1:1 (h:h) oranında SIF ile karıştırılmış ve 37°C'de 120 dakika inkübe edilmiştir. Her bir sindirim sıvısından sonra alınan örnekler 4000xg'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve ardından deiyonize su ile yıkanmıştır.

Partiküllerdeki korona yapısında bulunan proteinlerin belirlenmesi için elde edilen pelletler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Karışım içindeki proteinlerin molekül ağırlığına göre ayrılmasını sağlayan SDS-PAGE işlemi için Mini-PROTEAN® 3 Cell dikey elektroforezi sistemi ve POWER PAC-300 güç kaynağı (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, B.K.) kullanılmıştır. Bu amaçla elektroforez işlemi Laemmli metoduna

[103] göre hazırlanmış olan %13'lük (%T) ayırma jelinde gerçekleştirilmiştir. Bu analizde kullanılan çözeltiler ve jellerin içerikleri Çizelge 3.2., Çizelge 3.3., Çizelge 3.4., Çizelge 3.5. ve Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

Çizelge 3.2. SDS-PAGE analizinde kullanılmış olan elektroforezi tamponunun içeriği

Elektroforez Tamponu (5x)	500 mL
Glisin	47 g
Tris Bazı	7.55 g
SDS (%10)	25 mL

Çizelge 3.3. SDS-PAGE analizinde kullanılmış olan ayırma ve yükleme jeli içerikleri

%13'lük ayırma jeli	12 mL	%5.3'lük yükleme jeli	5 mL
Saf Su	3.285 mL	Saf Su	2.72 mL
%40'lık Akrilamid	3.99 mL	%40'lık Akrilamid	0.665 mL
%2'lik Bisakrilamid	1.51 mL	%2'lik Bisakrilamid	0.285 mL
1.5 M Tris Tamponu (pH=8.6)	3 mL	0.5 M Tris Tamponu (pH=8.6)	1.25 mL
%10'luk SDS	120 µL	%10'luk SDS	50 µL
%10'luk Amonyum Persülfat	90 µL	%10'luk Amonyum Persülfat	25 µL
TEMED	6 µL	TEMED	5 µL

Çizelge 3.4. SDS-PAGE analizi için kullanılan örnek yükleme tamponu içeriği

Örnek Yükleme Tamponu	18 mL
1 M Tris-Cl (pH=6.8)	2.5 mL
Gliserol	4.5 mL
SDS	1 g
Bromfenol Mavisi	20 mg
Saf su	2.5 mL
250 mM Ditiotreitol (DTT)	9.5 mL

Çizelge 3.5. SDS-PAGE analizi için kullanılan jel boyama çözeltisi

Boya Çözeltisi	100 mL
Asetik Asit	10 mL
Metanol	30 mL
Saf Su	60 mL
Coomasie Brilliant Blue	0.2 g

Çizelge 3.6. SDS-PAGE analizi için kullanılan jel yıkama çözeltisi

Yıkama Çözeltisi	100 mL
Asetik asit	10 mL
Metanol	30 mL
Saf su	60 mL

Ayırma jeli Çizelge 3'te gösterilen bileşenlerin karıştırılması ile hazırlanmış olup jel kasetine dökülmüş ve üzeri ince saf su ile kaplanmıştır. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra üste kalan saf su dökülmüş ve yükleme jeli Çizelge 3'te gösterilen bileşenlerin

karıştırılması ile hazırlanıp ayırma jelinin üstüne dökülmüş ve jel tarağı takılmıştır. Yükleme jeli de polimerleştikten sonra tarak çıkarılmıştır.

İncelenen örneklerde aynı partikül konsantrasyonunun sağlanması için, gıda matrisi-partikül etkileşiminden elde edilen pelletler ilk derişimlerine göre 50 kat, sindirim simülasyonunda SSF, SGF ve SIF sonrası elde edilen pellet örnekleri ise sırası ile 100, 200 ve 400 kat derişik olacak şekilde, Çizelge 3.4.'de gösterilen örnek yükleme tamponu ile çözdürülmüştür. Daha sonra proteinlerin denatürasyonu için örnekler 90°C su banyosunda 5 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Çözeltilerdeki proteinlerin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacı ile 10-250 kDa aralığındaki Bio-Rad Precision Plus Protein Standart (Unstained, #161-0363, Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, B.K.) belirteci kullanılmıştır. Elektroforez tankı kuyuları da dolduracak şekilde Çizelge 2'de verilen 5x tamponundan elde edilen 1x tamponu ile doldurulmuştur. Elde edilen örneklerden ve protein belirtecinden 10 µL alınarak jel kuyucuklarına yüklenmiştir ve jel kasedi elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez işlemi 20 mA sabit akımda gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jeller saf su ile yıkanıp ardından Çizelge.5'te verilen jel boyama çözeltisi içinde yaklaşık 20-30 dakika boyanmıştır. Ardından jeller 20-30 dakika boyunca Tablo.M6'da verilen boya yıkama çözeltisi içinde yıkanmıştır. Jel görüntüleri alındıktan sonra Agfa Foto Look (Agfa-Geavert N.V., Mortsel, Belçika) programı ile işlenmiştir.

3.2.8. *In-vitro* Toksisite

Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan Caco-2 (An 1) kolon hücreleri Şap Enstitüsü'nden (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir. Caco-2 hücreleri %10 FBS, 2.5 mM L-glutamin ve 10 µM penisilin/streptomisin içeren yüksek glukozlu Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) içinde geliştirilmiştir. Önceki pasajdaki hücre kültürü içindeki besi yeri dikkatlice boşaltıldı. Daha sonra şişeye ölü hücreleri uzaklaştırmak için 1 mL tuzlu fosfat tamponu (PBS) eklenmiştir. Canlı hücreleri kaldırmak içinse eklenen PBS geri boşaltıldı ve 1-1.5 mL 1x %0.25 EDTA içeren Tripsin eklendikten sonra şişe hafifçe çalkalandı ve 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren karbondioksit inkübatöründe (NÜVE EC160 CO₂ İnkübatörü, Ankara, Türkiye) 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 5 mL'ye DMEM ile tamamlanmıştır. Daha sonra şişe iyice karıştırılıp hücre kültürü 15 mL steril falkona alındı. Daha sonra 1000 rpm'de santrifüj edilip süpernetantı atıldı. Atılan

süpernetant yerine 3 mL'ye tamamlanana kadar DMEM eklenmiştir. Daha sonra bu stoklar hücre sitotoksitesi ve ROS analizlerinde kullanılmıştır.

Mikroplastik muamelesi için yağlı ve yağsız süt örnekleri ile farklı konsantrasyonlardaki PSMP 1 saat boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası gıda matrisi partikül karışımı sindirim simülasyonuna tabi tutulmuştur. *In-vitro* toksisite çalışmalarında mikrolplaka kuyucuklarındaki PSMP konsantrasyonları 2 ve 200 µg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.8.1 MTT ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

PSMP, d-PSMP ve gıda matrisi ile inkübe edilmiş PSMP ve d-PSMP'lerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. Bu analiz için ilk önce, 25 ile 35 numaralı pasajlar arasındaki hücreler 5×10^4 hücre/kuyu konsantrasyonunda 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve DMEM içerisinde 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂ koşullarına ayarlanan karbondioksit inkübatöründe (NÜVE EC160 CO₂ İnkübatörü, Ankara, Türkiye) gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyuların içindeki besiyeri dikkatlice hücrelere zarar vermeden boşaltılmıştır. Daha sonra kuyulardaki hücrelere, 90 µL DMEM ve partikül konsantrasyonu 2 µg/mL ve 200 µg/mL olacak şekilde 10µL PSMP, d-PSMP, süt örnekleri ile etkileştirilmiş PSMP ve d-PSMP örnekleri eklenmiştir. Bu aşamada kontrol olarak partikül içermeyen su, sindirim sıvısı ve süt örnekleri kullanılmıştır. Bu işlemde sonra kuyular, 24 saat boyunca 37°C'de karbondioksit inkübatöründe maruziyete bırakılmıştır. Bu süre sonunda kuyular içindeki DMEM dikkatlice boşaltılmış, kuyulara 90 µL DMEM ve PBS içinde hazırlanmış 10 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL) eklenmiş ve 4 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem koşullarındaki karbondioksit inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. Ölçüm öncesi kuyular hücrelere zarar vermeden boşaltılmıştır. MTT'nin mitokondriyal indirgenmesiyle oluşan formazonu çözmek için 100 µL DMSO kuyulara eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak, kuyuların 550 nm dalga boyundaki absorbansı Synergy-H1 Hibrid Mikrolplaka Okuyucu ile ölçülmüştür. Analizler en az üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.2 Toplam Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü

Hücrelerin partiküllerle etkileşiminden sonra toplam ROS seviyelerindeki değişimin belirlenmesi amacıyla, floresans etiketi DCFH-DA kullanılmıştır. DCFH-DA hücre içine

nüfuz edip daha sonra hücre içi esterazlar ile 2',7'-diklorodihidrofloresine (DCFH) hidrolize olmaktadır. DCFH ise reaktif oksijen türleri ile floresans formu olan 2',7'-diklorofloroseine (DCF) dönüşmektedir [104, 105]. Hücrelerin partiküllerle etkileşiminden sonra toplam ROS seviyelerinin belirlenmesi amacıyla ilk önce, 25 ile 35 numaralı pasajlar arasındaki hücreler 5×10^4 hücre/kuyu konsantrasyonunda 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve DMEM içerisinde 37°C 'de %95 nem ve %5 CO_2 koşullarına ayarlanan karbondioksit inkübatöründe gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyular boşaltılıp, 90 μL DMEM ve partikül konsantrasyonu 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde 10 μL PSMP, d-PSMP, süt örnekleri ile etkileştirilmiş PSMP ve d-PSMP örnekleri eklenmiştir. Kontrol olarak kuyulara partikül içermeyen su, sindirim sıvısı ve süt örnekleri eklenmiştir. Daha sonra, 24 saat boyunca 37°C 'de, %5 CO_2 ve %95 nem ortamı sağlayan karbondioksit inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdiğinde, kuyular dikkatlice boşaltılmıştır. Önceden 37°C 'ye ısıtılmış 10 μL DCFH-DA ve 90 μL Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) kuyulara eklenmiştir. Hazırlanan kuyular 37°C 'de 30 dakika karbondioksit inkübatöründe inkübe edilmiştir. Süre sonunda, kuyular dikkatlice boşaltılmış ve hücreleri parçalamak için 200 μL radyo-immünopresipitasyon deney (RIPA) tamponu (50 mM Tris-HCl 7.4 pH, 50 mM NaCl, 2mM EDTA, %0.1 SDS, 1mM DTT) kuyulara eklenmiştir [106]. Son olarak, örnekler buz üstünde 5 dakika bekletilmiş ve 5 dakika sonunda kuyuların 485 nm uyarım 530 nm emisyon dalga boyunda floresans intensiteleri Synergy-H1 Hibrid Mikroplaka Okuyucu ile ölçülmüştür.

3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen verilerin SPSS 23.0 (IBM SPSS Statistic 23, IBM Co., Armonk, NY, A.B.D.) programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Örneklerin varyanslarının homojenliği $p < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre Levene testi ile belirlenmiştir. Örnekler arasındaki farklılığın önem kontrolü $p < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre, ANOVA ve varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey, olmadığı durumlarda ise Games-Howell post-hoc testleri kullanılarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

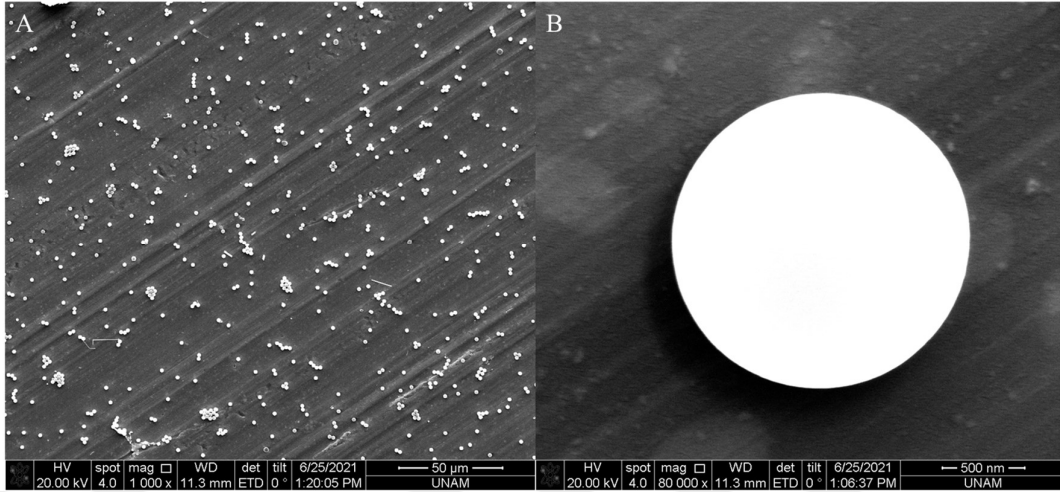
4.1. Süt Kompozisyonu ve Partikül Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında gerçek gıda örneği olarak kullanılan yağlı ve yağsız sütlerin kompozisyonu Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Yağlı ve yağsız süt örneklerine ait değerler TS1192 Uzun Ömürlü Süt (UHT) standardına [107] uygunlukları kontrol edilmiştir.

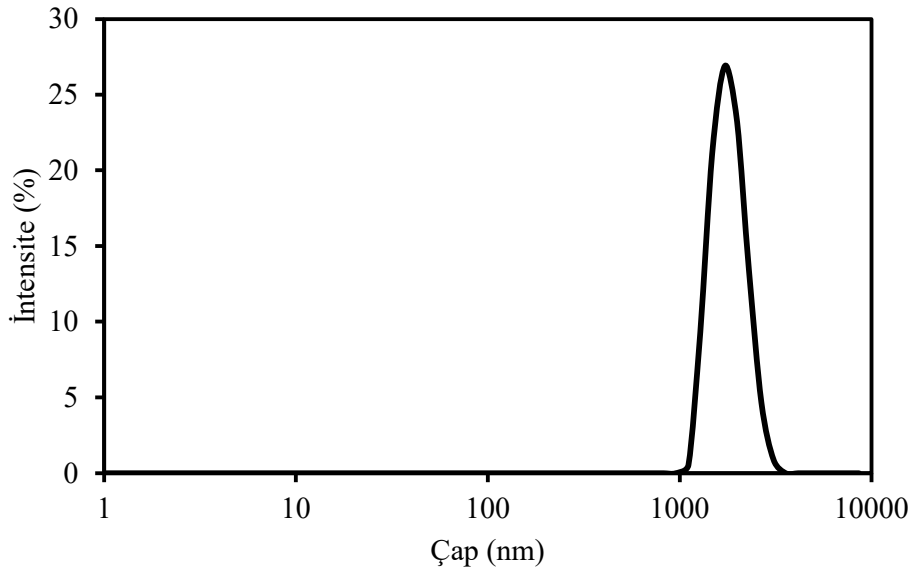
Öncelikle tez çalışmasında kullanılan PSMP'lerin karakterizasyonu yapılmıştır. Partiküllere ait ESEM görüntüleri Şekil 4.1.'de, DLS spektrumu Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. ESEM görüntülerinde partikül büyüklüklerinin ve şekillerinin homojen olduğu ve partikül yüzeylerinin pürüzsüz olduğu görülmüştür. DLS sonuçlarına göre PSMP'lerin ortalama hidrodinamik çapı $1.823 \pm 0.0927 \mu\text{m}$ olarak saptanmıştır. Ayrıca, ζ -potansiyeli $-33.7 \pm 1.230 \text{ mV}$ olarak literatürle uyumlu bulunmuştur. Bu konuda yapılan çalışmalarda, ortamda tuz ve organik bileşikler yokken polistiren partiküllerinin zeta potansiyellerinin negatif olduğu [108, 109] ve polistiren mikropartiküllerinin göl ve nehir gibi tuzsuz sularda agregasyona eğilimlerinin olmadığı belirtilmiştir [108]. ESEM görüntüleri ve DLS sonuçları partiküllerin saf su içinde agregat olmadıklarını göstermektedir.

Çizelge 4.1. Tez kapsamında kullanılan yağlı ve yağsız sütlerin kompozisyonu.

Örnek	Kuru madde (%)	Yağsız Kuru madde (%)	Protein (g/100mL)	Yağ (%)	Yoğunluk (g/cm ³)	pH
Yağlı Süt	11.489 ± 0.044	8.6	3.345 ± 2.73	2.9 ± 0.1	1.030	6.925
Yağsız Süt	9.064 ± 0.034	9.1	3.019 ± 2.26	0.0 ± 0.1	1.035	6.864



Şekil 4.1. Çalışma kapsamında kullanılan PSMP'lerin A) 1000x ve B) 80000x büyütme değerlerindeki ESEM görüntüleri.



Şekil 4.2. Çalışma kapsamında kullanılan PSMP'lerin (3 mg/mL) DLS spektrumu.

4.2. Gıda Matrisi-Partikül Etkileşimi

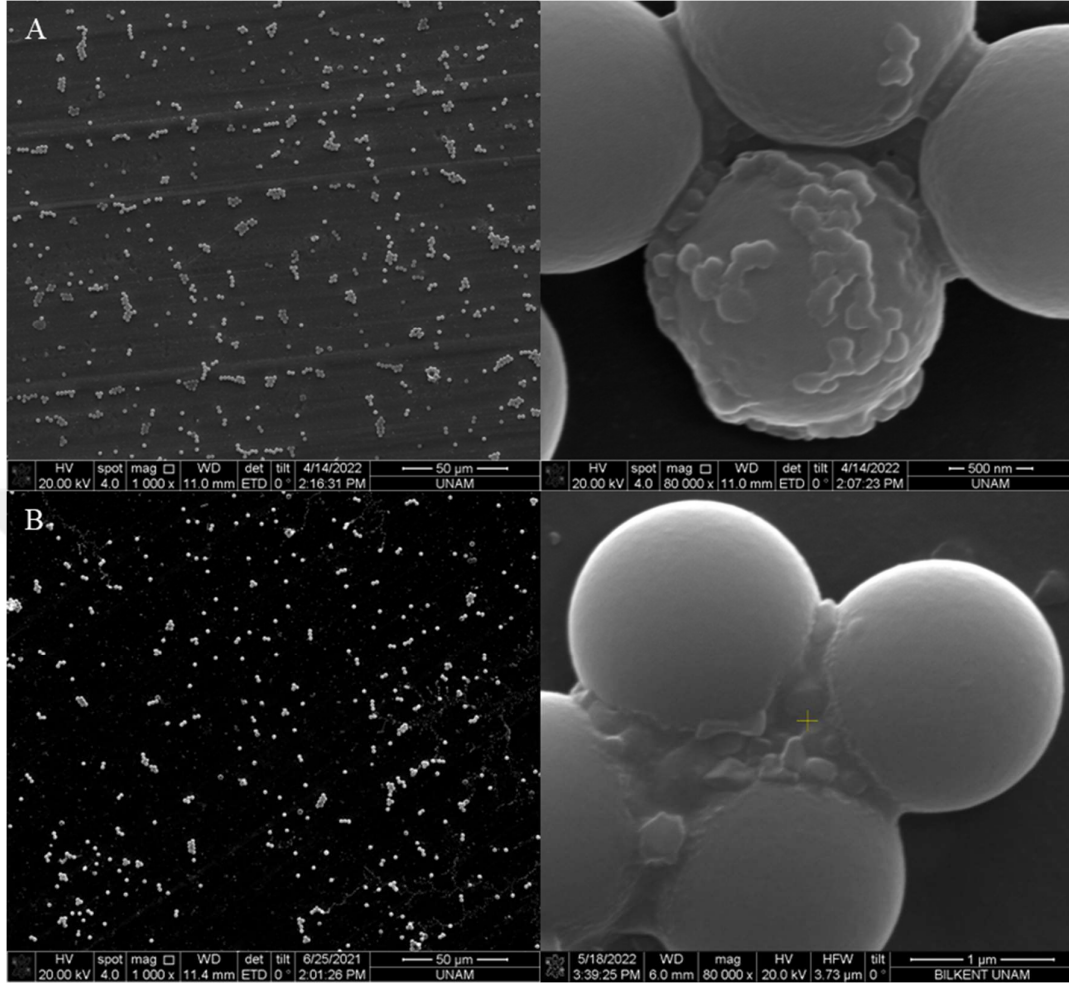
Bu tez çalışması kapsamında, öncelikle PSMP'lerin gıda ortamı olarak seçilen seyreltilmiş yağlı ve yağsız süt örnekleri ile etkileşimi ve bu etkileşim sonucu oluşan protein korona yapısı incelenmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki PSMP'ler yağlı ve yağsız süt örnekleri ile inkübe edilmiş daha sonra santrifüj kullanılarak süt

ortamından ayrıştırılmıştır. Daha sonra partiküller üzerindeki protein korona yapısı ve partikül morfolojisi incelenmiştir.

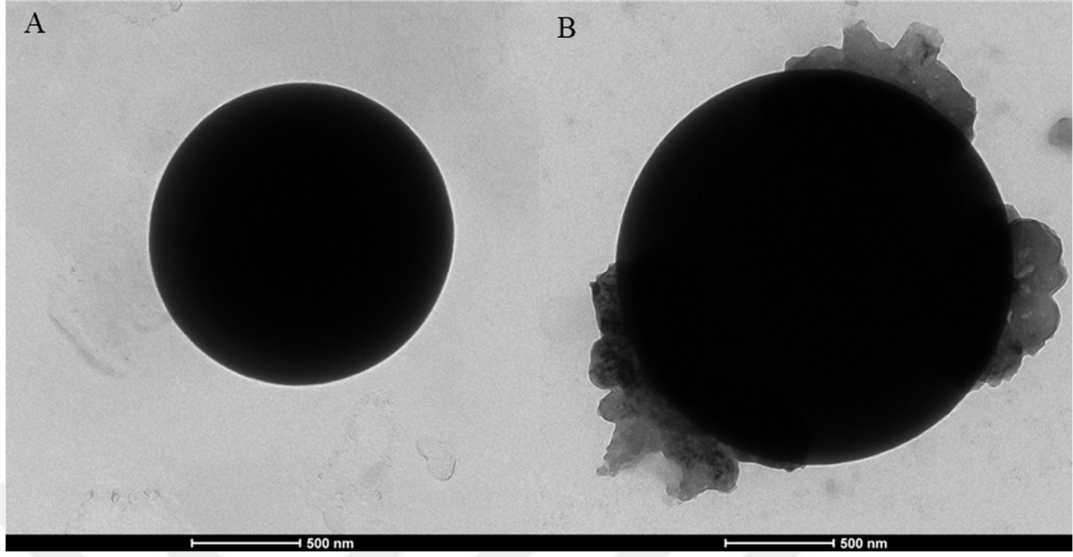
4.2.1. Gıda Matrisinin Partikül Özellikleri Üzerine Etkisi

Tez çalışmasının ilk aşamasında gıda ortamı olarak ele alınan seyreltilmiş yağlı ve yağsız süt örnekleri ile PSMP'lerin etkileşimi sonucu partikül morfolojisi incelenmiştir. Bu amaçla, etkileşim sonrası PSMP'ler serbest süt ortamından ayrıldıktan sonra, partiküllerin ESEM (Şekil 4.3) ve TEM (Şekil 4.4) görüntüleri alınmıştır. Partiküllere ait ESEM görüntüleri incelendiğinde, hem yağlı süt örneği ile (Şekil 4.3A), hem de yağsız süt ile (Şekil 4.3B) etkileştirilmiş partiküllerin agregasyon eğilimine girmediği görülmektedir. Bunun yanı sıra, süt matrisleri ile inkübasyon sonrası partiküllerde korona yapısının oluştuğu, ancak bu yapının partikül yüzeyini tamamen kaplayan bir katman yerine, partikül yüzeyinin bir kısmıyla etkileşen yapılar olduğu görülmüştür (Şekil 4.3A, Şekil 4.3B).

Partiküllere ait TEM görüntüleri, yağ globüllerinin girişim yapması nedeniyle, sadece yağsız süt ile etkileştirilen PSMP'ler için alınmıştır. Bu görüntüler incelendiğinde de gıda matrisi ile etkileşime girmeyen partiküller pürüzsüz bir yüzeye sahipken (Şekil 4.4A), süt örneği ile etkileşen partiküllerin yüzeyinde oluşan korona yapısı dikkat çekmektedir (Şekil 4.4B). Burada da partikül yüzeyi makromoleküllerle tamamen kaplanmamış, yüzeyin bir kısmında korona yapısı oluşmuştur.

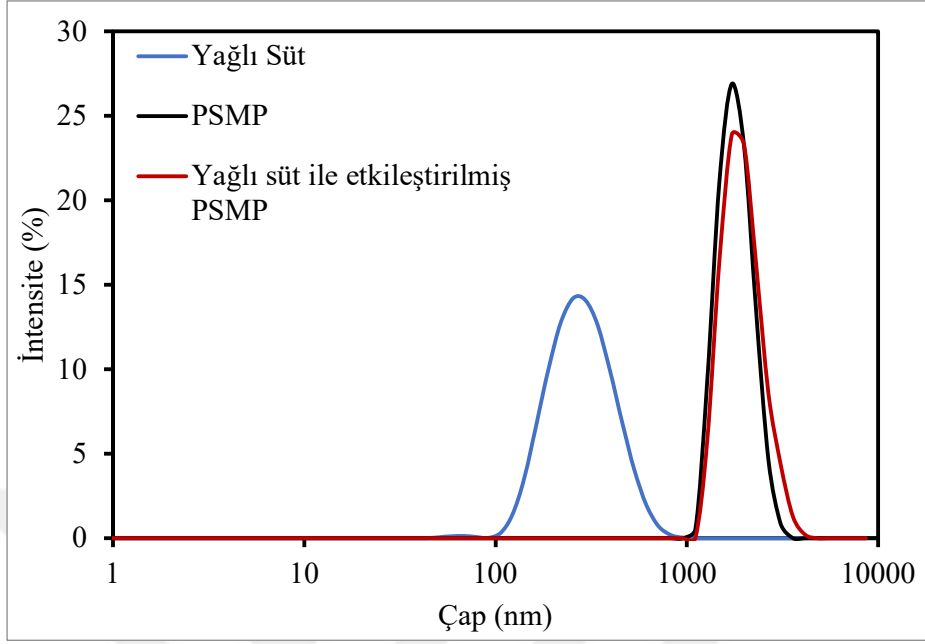


Şekil 4.3. PSMP'lerin A) yağlı süt örneği ve B) yağsız süt örneği ile etkileştirildikten sonra elde edilen 1000x (soldaki) ve 80000x (sağdaki) büyütme değerlerindeki ESEM görüntüleri.

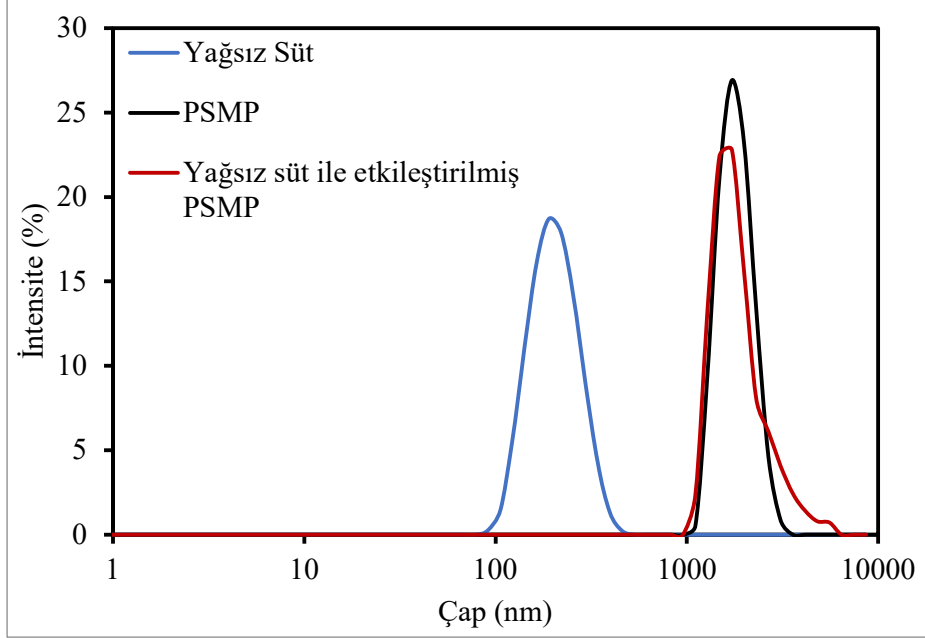


Şekil 4.4. PSMP'lerin A) süt örneği ile etkileştirilmeden ve B) yağsız süt ile etkileştirildikten sonra elde edilen TEM görüntüleri.

Tez çalışması kapsamında, bir sonraki aşamada PSMP'lerin gıda matrisi ile etkileştikten sonra hidrodinamik çapları ve yüzey net yüklerinde meydana gelen değişim ile incelenmiştir. Çizelge 4.2.'de partiküllerin inkübasyon öncesi ve farklı gıda matrisleri ile etkileşim sonrası ortalama hidrodinamik çap ve ζ -potansiyel değerleri gösterilmiştir. Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da sırasıyla yağlı süt ve yağsız süt örneği ile etkileştirilen PSMP'lerin DLS spektrumlarındaki değişim verilmiştir.



Şekil 4.5. PSMP (3mg/mL), yağlı süt ve yağlı süt ile etkileştirilmiş PSMP (3mg/mL) örneklerinin DLS spektrumları.



Şekil 4.6. PSMP (3mg/mL), yağsız süt ve yağsız süt ile etkileştirilmiş PSMP (3mg/mL) örneklerinin DLS spektrumları.

Çizelge 4.2. Yağsız süt, yağlı süt, PSMP (3 mg/mL) ve süt örnekleri ile inkübe edilmiş PSMP'lere (3mg/mL) ait ortalama hidrodinamik çap ve ζ -potansiyel değerleri. Farklı büyük harfler ζ -potansiyelinde, farklı küçük harfler ise hidrodinamik çapta anlamlı düzeyde fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Örnek	ζ -Potansiyel (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
Yağsız Süt	-26.500 ± 0.914	0.076	209.3 ± 6.5
Yağlı Süt	-31.900 ± 0.681	0.154	299.0 ± 15.4
PSMP	-33.700 ± 1.230^A	0.134	1823.0 ± 97.2^a
Yağsız Süt - PSMP	-21.700 ± 0.434^B	0.125	1909.0 ± 398.1^a
Yağlı Süt - PSMP	-20.600 ± 0.864^B	0.138	1983.0 ± 267.5^a

Hem yağlı süt hem de yağsız süt ile inkübasyon sonrası PSMP'lerin ortalama hidrodinamik çap değerlerinde artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Süt ile etkileştirilen partiküllerin TEM analizlerinde görünen korona yapısının partikül yüzeyini tamamen kaplamaması ve yoğun olmaması, hidrodinamik çapta anlamlı bir değişimin olmamasına neden olmuş olabilir. Ayrıca, ortalama hidrodinamik çapta değişim olmaması, gıda matrisi ile etkileşimden sonra da PSMP'lerin dispers yapılarını koruduklarını göstermiştir.

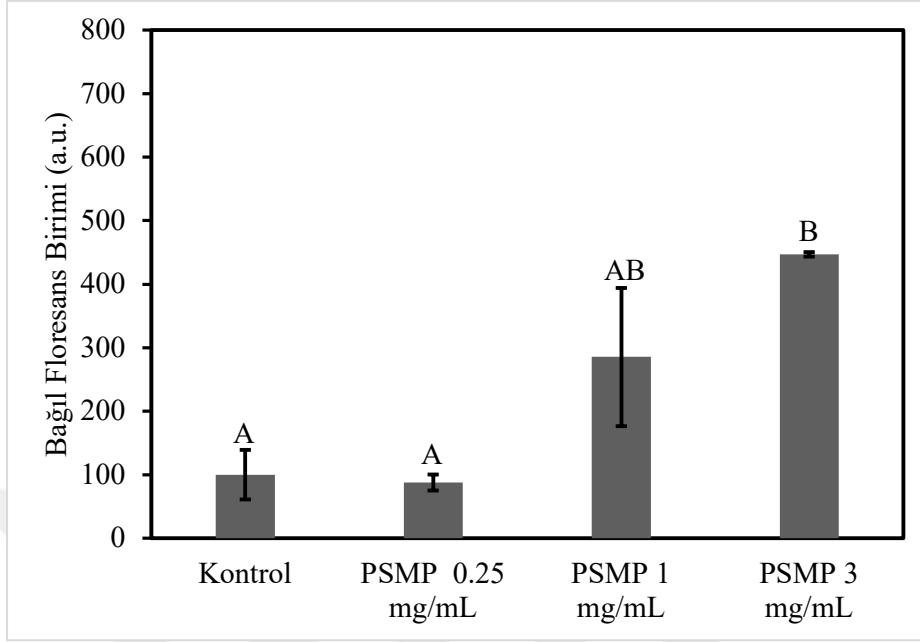
Yağlı süt, yağsız süt ve PSMP'ye ait ζ -potansiyel değerleri incelendiğinde, bu değerlerin birbirine çok yakın olduğu gözlemlenmiştir. Ancak süt örnekleri ile etkileştirilen PSMP'lerin net negatif yükünün hem gıda matrisinden hem de süt ile etkileştirilmemiş partiküllerden daha az olduğu görülmekle birlikte, net yükün hala negatif olduğu belirlenmiştir. Gıda matrisi ile etkileşimden sonra partiküllerin ζ -potansiyellerindeki bu değişimin, partikül yüzeyine bağlanan makromoleküllerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yağlı süt ve yağsız süt ile etkileştirilmiş PSMP'lerin ζ -potansiyellerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu nedenle partikülün ζ -

potansiyelini etkileyen nedenin yağ globülleri olmadığı düşünülmektedir. Nötral çözeltilerde β -laktoglobülinin ve α -laktalbüminin yüzey yükü sırasıyla -15.0 mV ve -2.0 mV olduğu belirtilmiştir [110]. Ayrıca pH 6.6'da β -kazein ve α_{s2} -kazeinin yükleri sırasıyla -15 ve -12 mV olarak belirtilmiştir [111]. Süt ile etkileştirilmiş PSMP'lerin net negatif yükündeki azalışın korona yapısındaki bu proteinlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

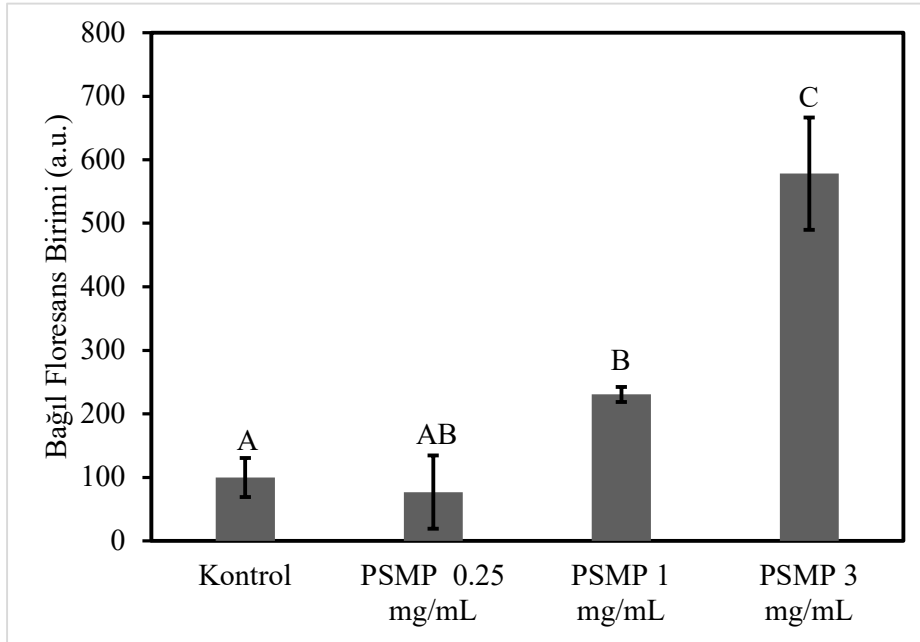
4.2.2. Protein Korona Yapısının Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında, gıda matrisi ile etkileşen farklı konsantrasyondaki PSMP'lerin korona yapısında yer alan protein miktarları belirlenmiştir. Bu amaçla, yağlı ve yağsız süt örnekleri ile inkübe edilen PSMP'ler etkileşim sonrasında ortamdan ayrılmış ve partikül yüzeyine adsorblanan proteinler floreskamin ile işaretlenmiştir. Kontrol olarak partikül içermeyen süt örneklerine de aynı işlem uygulanmış ve santrifüj sonrası floreskamin işaretlemesi gerçekleştirilmiştir. Yağlı süt ile inkübe edilen partiküllerden elde edilen floresans intensiteleri Şekil 4.7'de, yağsız süt ile inkübe edilen partiküllerden elde edilen floresans intensiteleri ise Şekil 4.8'de verilmiştir.

Hem yağlı süt hem de yağsız süt ile inkübe edilen örneklerde PSMP konsantrasyonu arttıkça, floresans yoğunluğunun arttığı görülmüştür. Bu durum, ortamdaki partikül miktarı arttıkça partikül yüzeyine bağlanan protein miktarının da artmasından kaynaklanmaktadır. Yağsız süt ile etkileştirilmiş 1 ve 3 mg/mL'lik konsantrasyonlardaki PSMP'ler ile kontrol arasında anlamlı fark var iken, yağlı süt ile etkileştirilmiş sadece 3 mg/mL'lik konsantrasyondaki PSMP ile kontrol arasında anlamlı fark gözlemlenmiştir. Tan ve ark. [112], yaptıkları çalışmada polistiren partiküllerinin emülsiyondaki yağ damlacıkları ile etkileştiğini göstermiştir. Yağlı süt ile etkileşen PSMP'lerin sadece yüksek konsantrasyonda anlamlı fark göstermesi partiküllerin süttteki yağlar ile etkileşime geçerek protein etkileşimini yavaşlattığı veya azalttığı düşünülmektedir.



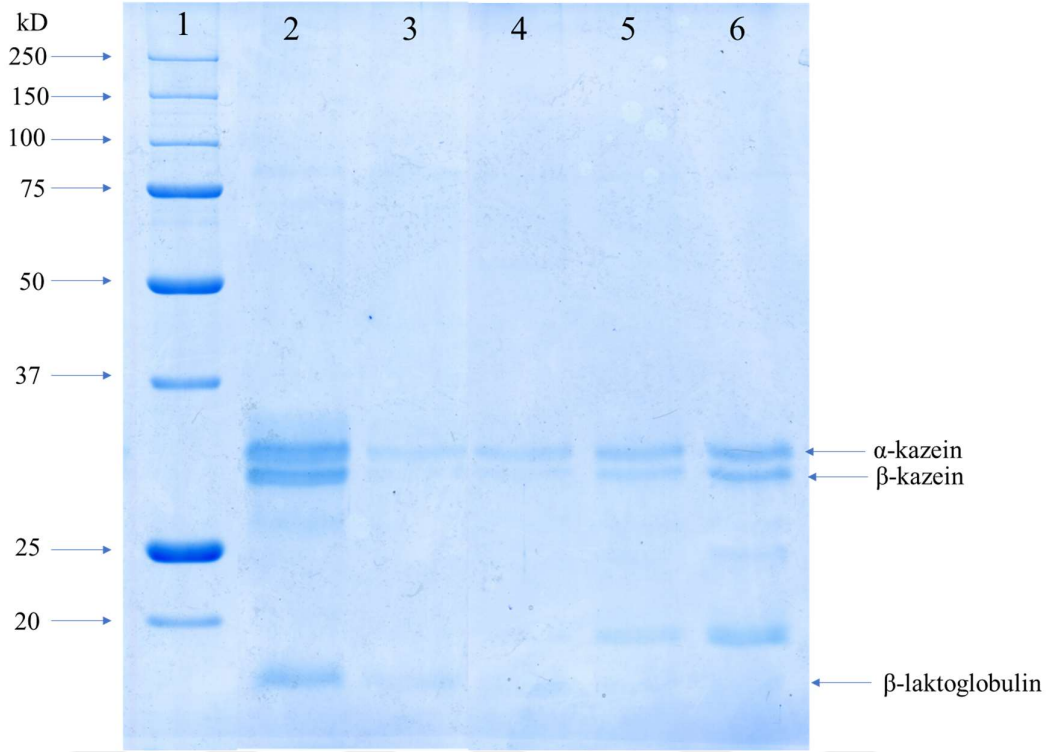
Şekil 4.7. Yağlı süt örneği ile etkileştirilen farklı konsantrasyonlardaki PSMP'lerin bağıl floresans intensiteleri. Farklı harfler $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir.



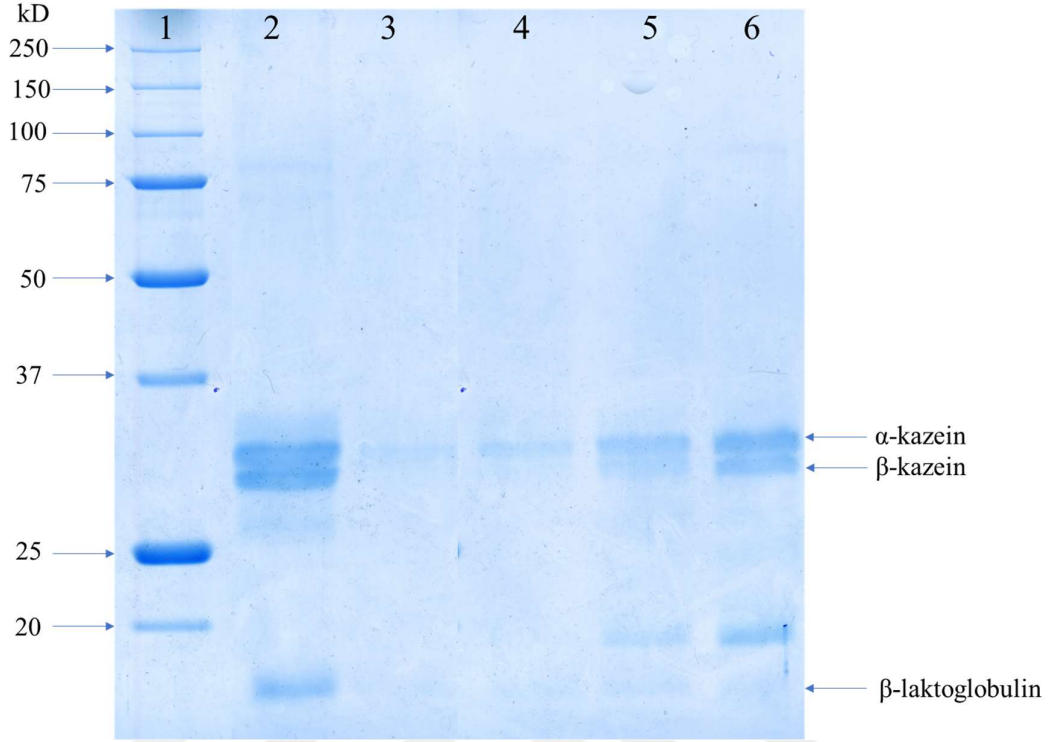
Şekil 4.8. Yağsız süt ile etkileştirilen farklı konsantrasyonlardaki PSMP'lerin bağıl floresans intensiteleri. Farklı harfler $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir.

PSMP'lerin korona yapılarındaki proteinlerin tanımlanması için SDS-PAGE analizi uygulanmıştır. Bu doğrultuda, süt örnekleri ile etkileştirilmiş PSMP örneklerinden inkübasyon sonrası santrifüj ile pelletler elde edilmiştir. Elde edilen pelletler örnek yükleme tamponu ile 50 kat derişik olacak şekilde çözdürülmüş sonra 90 °C'de 5 dakika denatüre edilmiştir. Denatüre edilen örnekler jel kuyucuklarına yüklenip 20 mA sabit akımda yürütülmüştür. Şekil 4.9'de yağlı süt ile etkileştirilen PSMP'lere, Şekil 4.10'de ise yağsız süt ile etkileştirilen PSMP'lere ait elektroforegramlar verilmiştir. Elde edilen elektroforegramlarda PSMP konsantrasyonu yükseldikçe protein bantlarının yoğunlaştığı gözlemlenmiştir. PSMP'lerin korona yapısında α -kazein ve β -kazein fragmentlerine ait bantların baskın olduğu görülmekle birlikte κ -kazein bandı tespit edilememiştir. Bu durumun, bazı plastiklerde olduğu gibi polistirenin apolar olmasından dolayı [113] görece daha hidrofobik kazein fragmentleri ile etkileşime girmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca Tan ve ark. [112], yaptıkları bir çalışmada polistiren partiküllerin diğer birçok plastiğe göre daha hidrofobik olduğunu göstermiştir. Ortamda yüksek konsantrasyonda partikül bulunduğu durumda, partikül yüzeyine bağlanan β -laktoglobüline ait bantlar da görünür hale gelmektedir. Bunun nedeni floreskamin sonuçlarında gösterilmiş olan partikül konsantrasyonu arttıkça bağladığı protein miktarının artmasına bağlı olarak, süt örneği ile etkileştirilen yüksek konsantrasyonlu partiküllerin SDS-PAGE şeridinde β -laktoglobülin bandının tespit sınırını geçtiği düşünülmektedir. Ayrıca süt yüksek sıcaklıklarda ısıtıldığı zaman β -laktoglobülin ile bazı kazein fraksiyonlarının disülfid köprüleri ile etkileştiği bilinmektedir [114]. β -laktoglobülin bandının görülmesinin bir diğer nedeni ise bu etkileşim sayesinde partiküle adsorblanan kazein ile gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, yüksek konsantrasyonda PSMP içeren örneklerde, yaklaşık 20 kDA büyüklüğünde yağlı ve yağsız süt örneklerinde olmayan protein bandı gözlemlenmiştir. Bu bandın protein-partikül etkileşiminin sebep olduğu bir protein fragmenti olabileceği düşünülmektedir. Literatürde mikroplastiklerin protein fragmentasyonuna neden olduğunu gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, elde edilen bu sonucun ileri çalışmalarla incelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca yağlı ve yağsız sütler ile etkileştirilen partiküller arasında farklı bir proteine rastlanmamıştır. Bu nedenle protein partikül etkileşiminde

etkileşen protein çeşitliliğinde yağın bir etkisi olmadığı düşünülmektedir.



Şekil 4.9. Yağlı süt ile etkileşen PSMP'lerin SDS-PAGE elektroforegramı. 1: Belirteç; 2: 66 kat seyreltilmiş Yağlı süt örneği; 3: Yağlı süt örneği (pellet); 4: Yağlı süt örneği + 0.25 mg/mL PSMP; 5: Yağlı süt örneği + 1 mg/mL PSMP; 6: Yağlı süt örneği + 3 mg/mL PSMP.



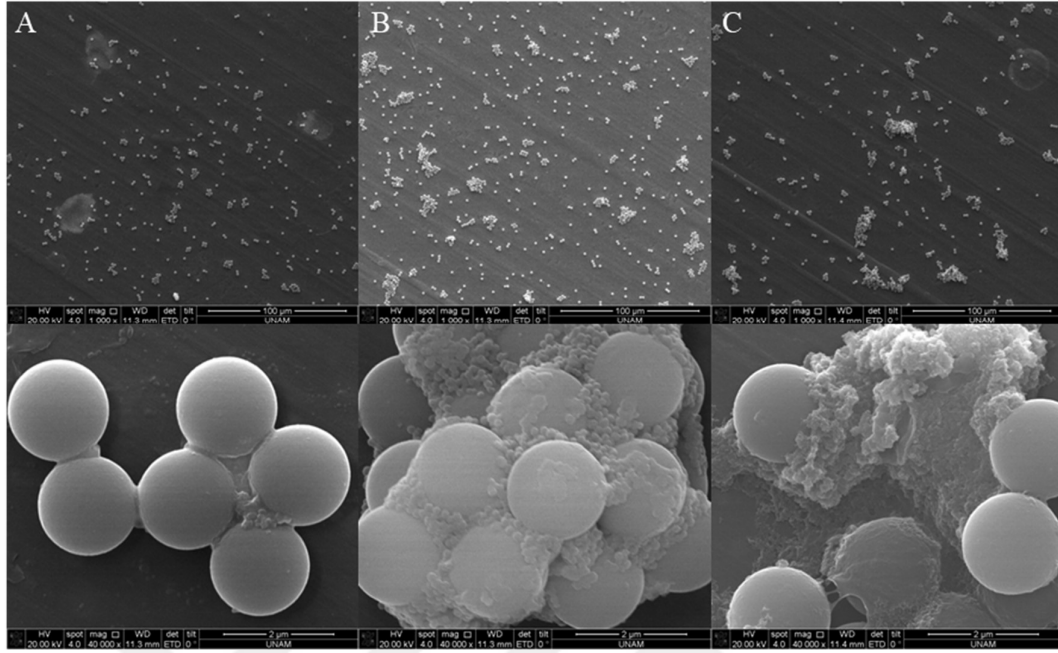
Şekil 4.10. Yağsız süt ile etkileşen PSMP'lerin SDS-PAGE elektroforegramı. 1: Belirteç; 2: 66 kat seyreltilmiş Yağsız süt örneği; 3: Yağsız Süt Örneği (pellet); 4: Yağsız süt örneği + 0.25 mg/mL PSMP; 5: Yağsız süt örneği + 1 mg/mL PSMP; 6: Yağsız süt örneği + 3 mg/mL PSMP.

4.3. *In-vitro* Sindirim Simülasyonu

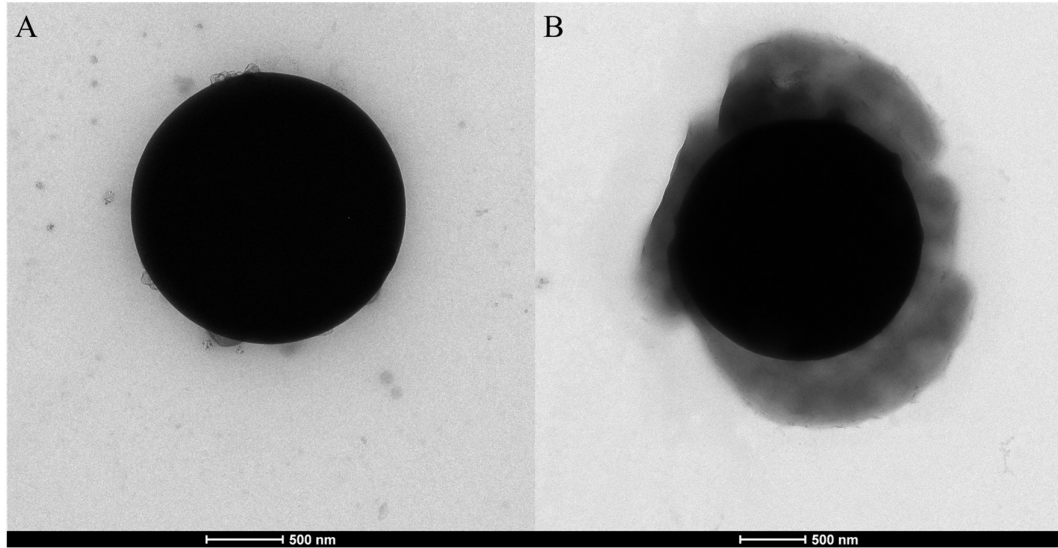
Bu tez çalışması kapsamında, gıda ortamı ile alınan PSMP'lerin ve gıda ortamı ile oluşturduğu protein korona yapısının gastrointestinal sistemdeki değişimini incelemek için *in-vitro* sindirim simülasyonu uygulanmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki (0.25, 1 ve 3 mg/mL) PSMP'ler ve bu partiküllerin yağlı ve yağsız süt örnekleri ile etkileştirilmiş halleri 37 °C'de sırasıyla 5 dk SSF, 120 dk SGF ve en son 120 dk SIF ile inkübe edilmiştir. Her bir sindirim sıvısı ile inkübasyon sonrasında örnekler alınmış ve partikülleri ve korona yapısını ortamdaki ayırmak için santrifüj ve yıkama işlemleri uygulanmıştır. Bu uygulama sonunda, partiküllerin agregasyon durumları, yüzey morfolojileri ve protein korona yapılarındaki değişiklikler incelenmiştir.

4.3.1. *In-vitro* Sindirim Simülasyonunun Partikül Özellikleri Üzerine Etkisi

Bu tez çalışması kapsamında *in-vitro* sindirim simülasyonunun iki farklı gıda matrisi ile inkübe edilmiş ve edilmemiş PSMP'lerin morfolojik özelliklerine etkisini incelemek amacı ile ESEM ve TEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Partiküllerin, sindirim simülasyonunun ilk aşaması olan ağız simülasyonu sonrası elde edilen ESEM görüntüleri Şekil 4.11.'de verilmiştir. SSF ortamında tüm partiküllerde agregasyon görülmekle birlikte, özellikle yağlı süt ve yağsız süt ile sindirime uğrayan partiküllerdeki agregasyonun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda ortamdaki iyonların, özellikle divalent katyonların polistiren partiküllerinin agregasyonunda etkili olduğunu belirtmiştir [43, 109]. Süt serumunda monovalent ve divalent katyonların olduğu da bilinmektedir [114]. Sindirim sıvısındaki katyonların dışında süt ortamında bulunan özellikle divalent katyonlarında ortama eklenmesi ile daha fazla ortamda katyon bulunması sonucu yağlı ve yağsız süt ile etkileştirilen örneklerde daha fazla agregasyon olduğu düşünülmektedir. Aynı örneklere ait TEM görüntüleri incelendiğinde ise (Şekil 4.12.), gıda matrisi ile etkileştirilmiş PSMP'lerde partiküllerin etrafında bulutsu yapı gözükmemektedir. Bu bulutsu yapının korona yapısı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, gıda matrisi ile etkileştirilmemiş PSMP'lerde bile ağız simülasyonu sonrasında partikül yüzeyindeki korona yapısı dikkat çekmektedir. Stock ve ark. [41], yaptıkları bir çalışmada farklı mikroplastiklere sindirim simülasyonu uygulamış ve sindirimin ilk aşaması olan ağız simülasyonundan sonra partiküllerin etrafında korona yapısı gözlemlendiğini belirtmiştir. Bu durum SSF sonrası PSMP'lerin etrafında korona yapısı olduğunu desteklemektedir. Ancak, gıda matrisi ile etkileştirilen partiküllerde bu korona yapısının çok daha kalın olduğu görülmüştür. Bunun nedeni hem simülasyon ortamında bulunan biyomoleküllerin hem de süt örneklerinden gelen biyomoleküllerin korona yapısına katıldığı düşünülmektedir. Ayrıca, gıda matrisi ile etkileştirilen partiküllerde ortamdaki biyomolekül miktarının daha fazla olması bu korona yapısının daha kalın olmasında bir etken olduğu düşünülmektedir.

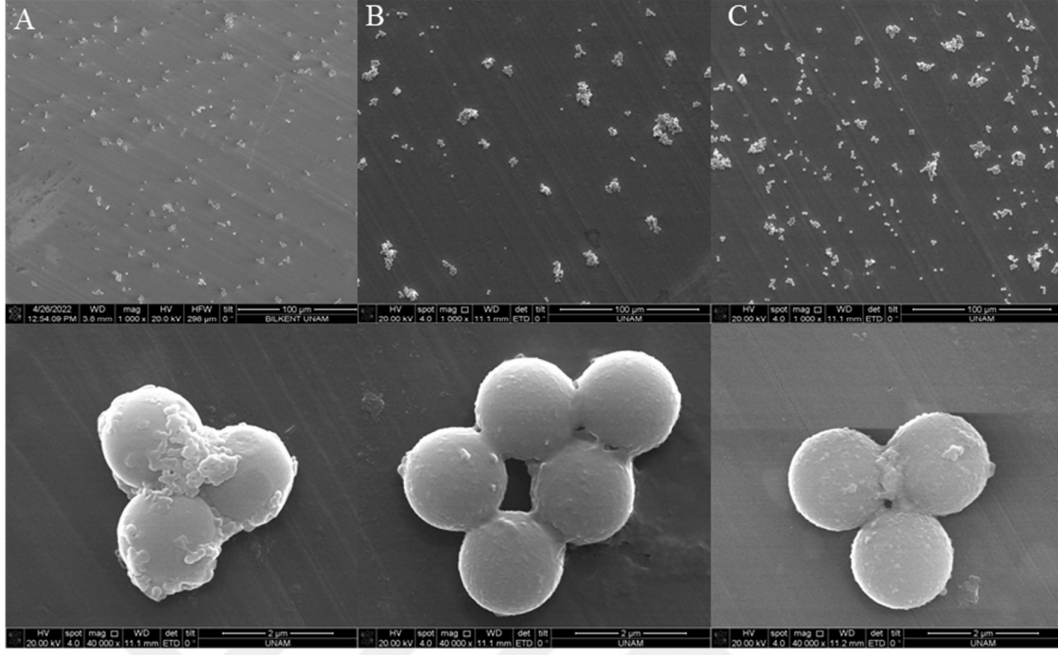


Şekil 4.11. Sindirim simülasyonunun SSF aşaması sonrası A) d-PSMP, B) yağlı süt ortamında d-PSMP ve C) yağsız süt ortamında d-PSMP'lere ait 1000x büyütme değeri (üsteki) ve 40000x büyütme değerindeki (alttaki) ESEM görüntüleri.

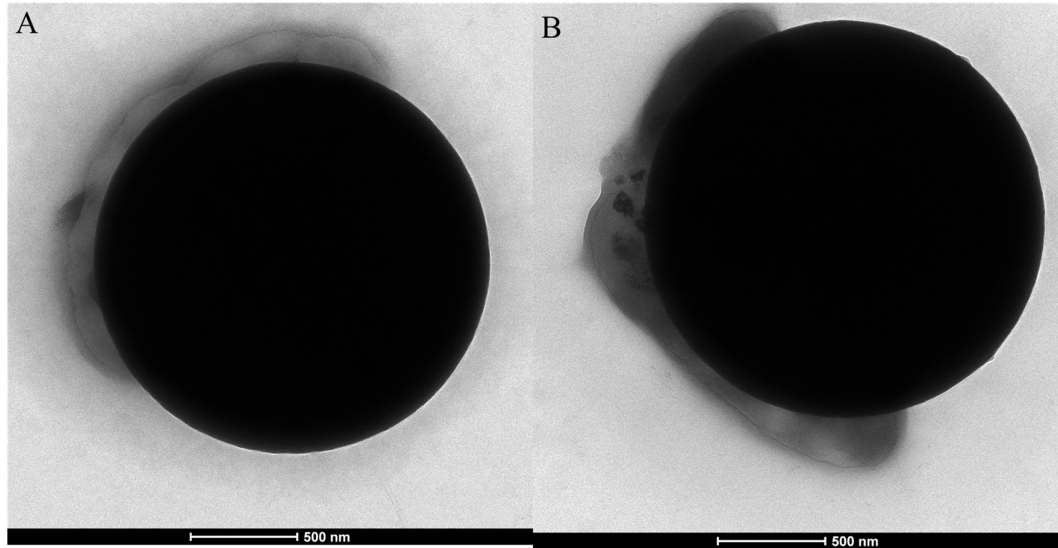


Şekil 4.12. Sindirim simülasyonunun SSF aşaması sonrası A) d-PSMP ve B) yağsız süt ortamındaki d-PSMP'lere ait TEM görüntüleri.

SGF sonrası d-PSMP'lerin ESEM görüntüleri Şekil 4.13.'de TEM görüntüleri Şekil 4.14.'da gösterilmiştir. Süt örnekleri ile etkileştirilmiş PSMP örneklerinin içinde agregat yapılar olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun, ağız ortamında olduğu gibi, süt ile ortama dahil olan katyonların yanında, SGF'de bulunan katyonlardan da kaynaklandığı düşünülmektedir. Lu ve ark. [109], yaptıkları bir çalışmada pH 3'ün altında polistiren partiküllerinin hidrodinamik çaplarında artış meydana geldiğini göstermişlerdir. Bu durum mide ortamında görülen agregasyonu desteklemektedir. Ma ve ark. [115] yaptıkları bir çalışmada, altın nanopartiküllerin yüzeyindeki protein korona yapısının enzimatik olarak bozulduğunu göstermiştir. Ayrıca bu bozulmanın ardından partiküllerin stabilitesinin bozulduğu ve agregasyon gözlemlendiği belirtilmiştir. Ayrıca TEM görüntülerinde yağsız süt ile etkileştirilmiş partikülün etrafındaki bulutsu yapının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu azalmanın nedeninin, bulutsu yapıdaki büyük proteinlerin SGF içindeki pepsin enzimleri tarafından parçalanması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, süt ile etkileştirilmemiş partiküllerde gözüken ince bulutsu yapı, sindirim sıvısındaki enzim ve BSA gibi biyomoleküllerden kaynaklanmış olabilir. Benzer şekilde, Stock ve ark. [41], mikroplastiklerle ilgili yaptıkları bir çalışmada, özellikle polistiren olmak üzere mikroplastiklerin sindirim simülasyonu süresince sindirim sıvısındaki organik maddeler ile korona yapısı oluşturduğunu belirtmiştir.

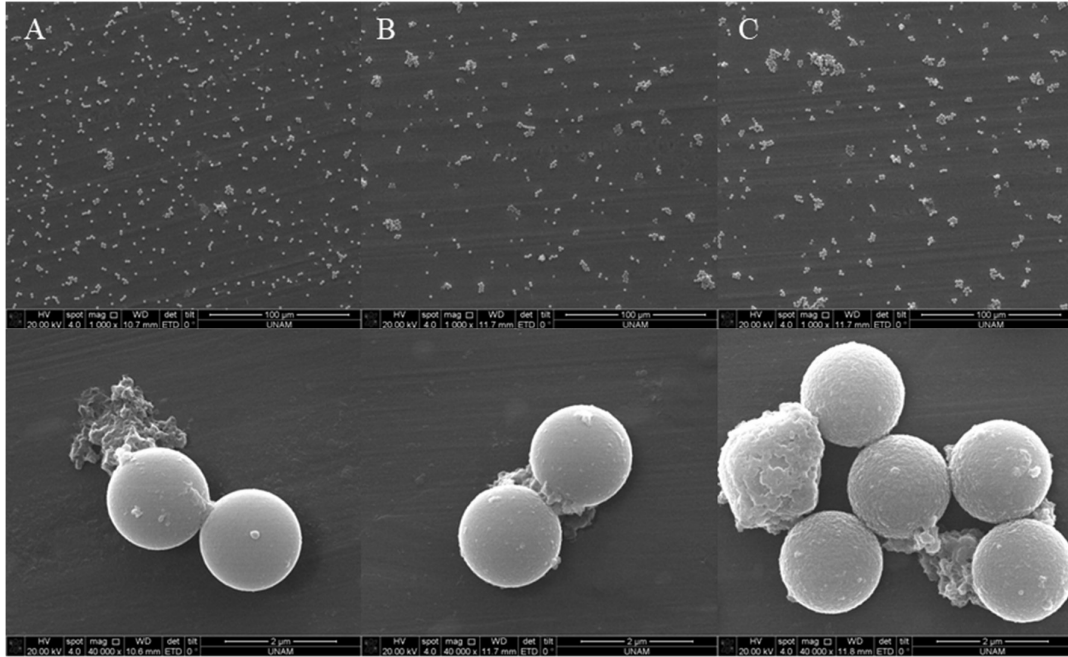


Şekil 4.13. Sindirim simülasyonunun SGF aşaması sonrası A) d-PSMP, B) yağlı süt ortamında d-PSMP ve C) yağsız süt ortamında d-PSMP'lere ait 1000x büyütme değeri (üstteki) ve 40000x büyütme değerindeki (alttaki) ESEM görüntüleri.

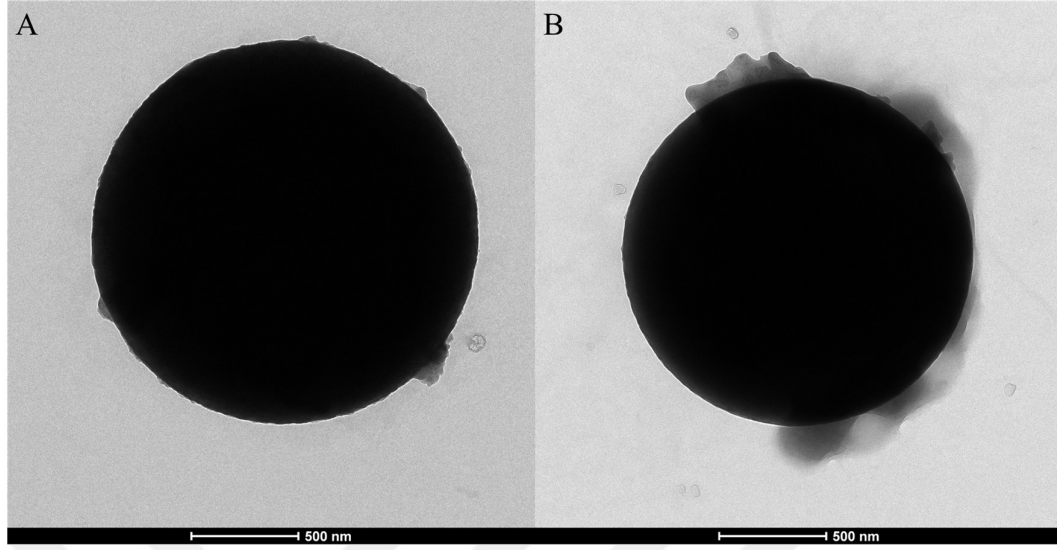


Şekil 4.14. Sindirim simülasyonunun SGF aşaması sonrası A) d-PSMP ve B) yağsız süt ortamındaki d-PSMP'lere ait TEM görüntüleri.

SIF sonrası d-PSMP'lerin ESEM görüntüleri Şekil 4.15'de TEM görüntüleri ise Şekil 4.16'da verilmiştir. SIF sonrası süt ile etkileştirilen partiküllerin ESEM görüntülerinde süt ile etkileştirilmeyen partiküle göre daha fazla agregre olmuş yapı gözükmektedir. Ancak bu durum SGF ve SSF görüldüğü kadar belirgin değildir. Yani süt ile etkileştirilmiş partiküllerin agregasyonun SIF ortamında bozulduğu görülmüştür. Lu ve ark. [109], yaptıkları çalışmada pH 3'ün altında polistiren partiküllerinin hidrodinamik çaplarının arttığını ancak pH 3 ve pH 8 arasında hidrodinamik çapta bir değişim olmadığını göstermiştir. Bu durumun, çalışmamızda mide simülasyonu sonrası bağırsak simülasyonunda pH'ın tekrardan pH 3'ün üzerine çıkması ile agregasyonun bozulduğunu desteklediği düşünülmektedir. TEM görüntülerinde partikül etrafındaki bulutsu yapıların incelmekle birlikte hala var olduğu gözükmektedir. Bunun nedeninin, SGF'den sonra SIF içindeki pankreatik enzimlerin de protein-peptit parçalanmasına devam etmesi olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.15. Sindirim simülasyonunun SIF aşaması sonrası A) d-PSMP, B) yağlı süt ortamında d-PSMP ve C) yağsız süt ortamında d-PSMP'lere ait 1000x büyütme değeri (üstteki) ve 40000x büyütme değerindeki (alttaki) ESEM görüntüleri.



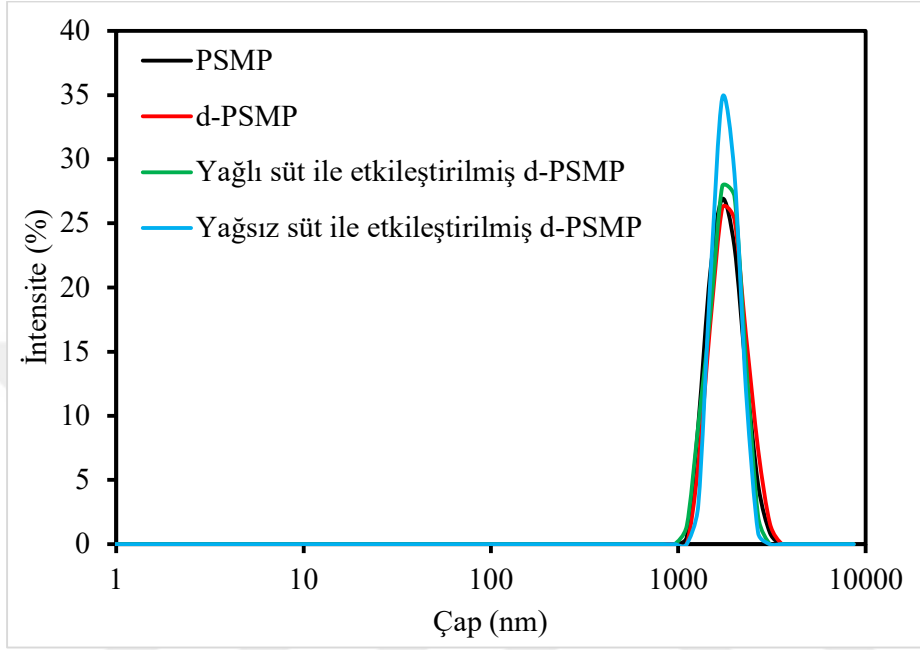
Şekil 4.16. Sindirim simülasyonunun SIF aşaması sonrası A) d-PSMP ve B) yağsız süt ortamındaki d-PSMP'lere ait TEM görüntüleri.

Gıda matrisi ile etkileştirilmeyen ve etkileştirilen PSMP'lerin *in-vitro* sindirim simülasyonu sonunda hidrodinamik çapları ve ζ -potansiyelleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Sindirim simülasyonu sonunda süt ile etkileştirilmemiş partiküllerin ζ -potansiyeli sindirim öncesindeki partiküllerin ζ -potansiyeline göre anlamlı bir farklılık göstermektedir. Bu durumun, süt ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerinin korona yapısının süt ile etkileştirilmemiş d-PSMP örneklerinin korona yapısından farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun nedeni süt ile etkileştirilmeyen partiküllerin süt ile etkileştirilen partiküllere göre daha çok veya tamamen sindirim sıvısındaki enzimler ve BSA gibi başka biyomoleküller ile etkileşime girmiş olabileceği fikridir. Daha önce Polistiren partiküllerinin BSA ile protein korona yapısı oluşturduğu belirtilmiştir [43, 72]. Literatürde yapılan çalışmalarda BSA'nın [43, 72] ve sindirim enzimlerinin [42] polistiren partikülleri ile etkileşiminin polistiren partiküllerinin negatif net yükünü azalttığını göstermiştir. Ayrıca BSA ve tripsin ile etkileşen partiküllerin net negatif yükleri sırasıyla yaklaşık -19.6 [72], -17 [42] mV olduğu belirtilmiştir. Bu durum protein korona yapısındaki protein içeriğinin farklı olması hipotezimizi desteklemektedir. Yağlı süt ile inkübe edilmiş d-PSMP, yağsız süt ile inkübe edilmiş d-PSMP ve tek başına d-PSMP örneklerine ait DLS spektrumları Şekil 4.17.'de gösterilmiştir. Sindirim simülasyonu sonunda d-PSMP ve süt ile etkileştirilmiş d-PSMP'lerin hidrodinamik çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. DLS

spektrumlarına ve hidrodinamik çap sonuçlarına göre d-PSMP örneklerinde bir agregasyon gözükmemektedir. Ancak, süt ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerinin ESEM görüntülerinde agregasyon yapılarının var olduğu gözükmemektedir. ESEM görüntülerindeki agregasyon yapıları bütün partiküllerde görülmediği için DLS sonuçlarında bu agregasyonun görülmediği düşünülmektedir. Ayrıca süt ile etkileştirilmiş d-PSMP'lerin PDI değerlerinin yüksek çıkması bu durumu destekler niteliktedir. Literatürdeki bazı çalışmalar pH 2 ile pH 8 arasında, pH arttıkça polistiren partiküllerin ζ -potansiyelinin negatif yönde arttığını (net negatif yükünün) göstermektedir [108, 109]. Sindirim simülasyonu sonunda d-PSMP örneklerinin ζ -potansiyelleri arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, süt ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerinin ζ -potansiyeli ile sindirim öncesindeki süt ile etkileştirilmemiş partiküllerin ζ -potansiyeline arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak, sindirim simülasyonu sonunda süt ile etkileştirilmemiş partiküllerin ζ -potansiyelleri sindirim öncesi süt ile etkileştirilmemiş partiküllerin ζ -potansiyelinden anlamlı derecede farklı çıkmıştır. Bunun nedeni süt ile etkileştirilmemiş d-PSMP örneklerinin protein korona yapısı süt ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerinin protein korona yapısındaki bağladıkları farklı proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.3. Sindirim simülasyonu sonunda alınan d-PSMP ve yağlı ve yağsız süt ile etkileştirilmiş d-PSMP'lerin ortalama çap, PDI ve ζ -potansiyel (mV) değerleri. Farklı büyük harfler ζ -potansiyelinde, farklı küçük harfler ise hidrodinamik çapta anlamlı düzeyde fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$).

Örnek	ζ -Potansiyel (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
PSMP 3 mg/mL	-33.7 ± 1.230^A	0.134	1823.0 ± 97.2^a
d-PSMP 3 mg/mL	-17.8 ± 0.656^B	0.160	1908.0 ± 301.7^a
Yağlı Süt - d-PSMP	-25.1 ± 8.490^{AB}	0.483	1806.0 ± 240.3^a
Yağsız Süt - d-PSMP	-26.0 ± 9.230^{AB}	0.359	1815.0 ± 136.1^a



Şekil 4.17. Sindirim simülasyonu sonunda elde edilen yağlı süt ve yağsız süt ile inkübe edilmiş d-PSMP, d-PSMP, PSMP (3 mg/mL) örneklerinin DLS spektrumu.

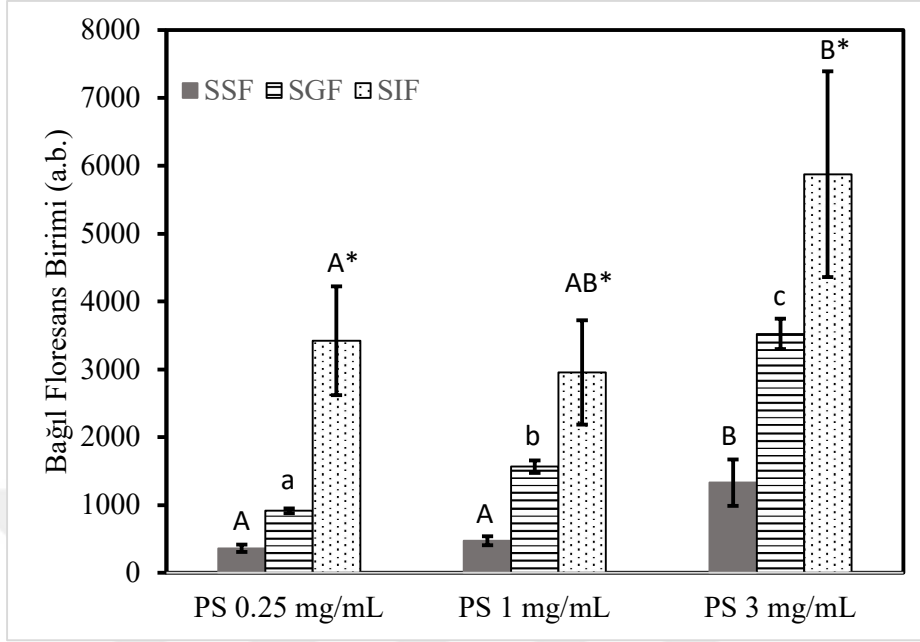
4.3.2. *In-vitro* Sindirim Simülasyonu Sonrası Protein Korona Yapısının Karakterizasyonu

Bu çalışma kapsamında *in-vitro* sindirim simülasyonunun partikül etrafındaki protein korona yapısına etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle, gıda matrisi ile etkileşen farklı konsantrasyondaki PSMP'lerin sindirim simülasyonu boyunca korona yapısında yer alan protein miktarları belirlenmiştir. Bu amaçla, yağlı ve yağsız süt ortamında bulunan PSMP'ler sindirim simülasyonuna tabi tutulmuş ve her bir sindirim ortamından alınan örneklerdeki partiküller ortamdaki ayrılarak, partikül yüzeyine adsorblanan proteinler floreskamin ile işaretlenmiştir. Kontrol olarak tek başına PSMP'lere de aynı işlem uygulanmış ve santrifüj sonrası floreskamin işaretlemesi gerçekleştirilmiştir. Sindirime uğramış tek başına PSMP'lerden elde edilen floresans intensiteleri Şekil 4.17.'de, yağlı süt ile inkübe edilen partiküllerden sindirim sonrası elde edilen floresans intensiteleri Şekil 4.18.'de ve yağsız süt ile inkübe edilen partiküllerden elde edilen floresans intensiteleri ise Şekil 4.19.'da verilmiştir.

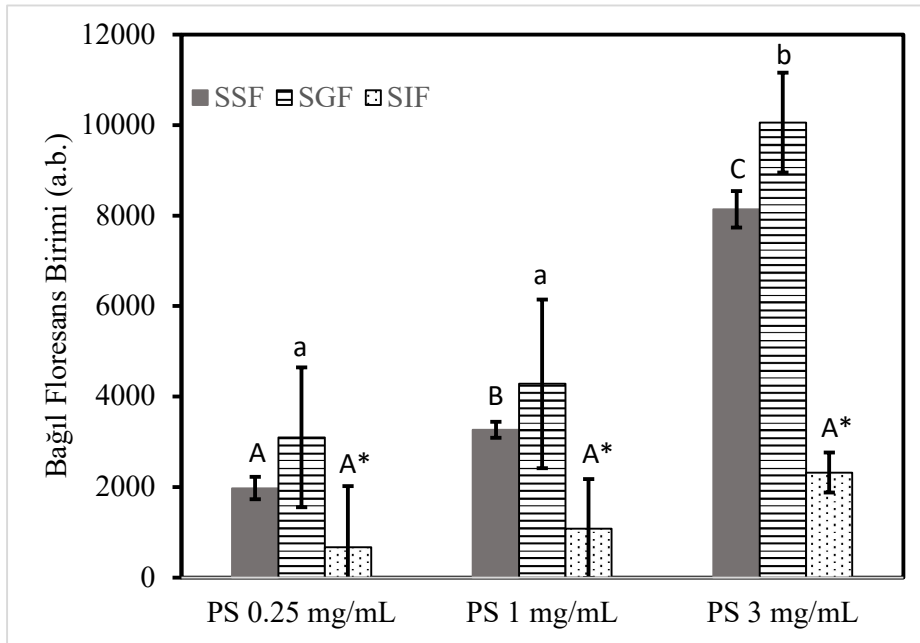
d-PSMP'ler konsantrasyon arttıkça floresans yoğunluğunun arttığı görülmektedir. Bunun nedeni sindirim sıvısı içindeki enzimler ve proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.'de sırasıyla yağlı ve yağsız süt ortamlarında inkübe olduktan sonra sindirim simülasyonu uygulanmış farklı konsantrasyonlardaki d-PSMP'lerin floresans intensiteleri gösterilmiştir.

Süt ile inkübe edilmemiş d-PSMP'lerinin floreskamin sonuçları göstermektedir ki partikül konsantrasyonu ile floresans intensiteleri arasında pozitif korelasyon gözükmemektedir. Partikül gıda matrisi etkileşiminde bulduğumuz sonuçlar bu sonucu desteklemektedir. Ayrıca, süt ile inkübe edilmemiş d-PSMP örneklerinin floresans intensiteleri sindirim simülasyonu boyunca arttığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin her bir sindirim ortamında biyomolekül miktarının artması olduğu düşünülmüştür. Wang ve ark. [42], yaptıkları çalışmada α -amilaz, pepsin ve tripsin gibi sindirim enzimlerinin polistiren partiküller ile protein korona yapısı oluşturduğu belirtilmiştir. Ayrıca, literatürde yapılan çalışmalar, polistiren partiküllerinin BSA ile protein korona yapısı oluşturduğunu belirtmiştir [43, 72].

Yağlı süt ile etkileştirilmiş d-PSMP'lerin floreskamin sonuçlarında SSF ve SGF sıvısı kendi içinde incelendiğinde partikül konsantrasyonu arttıkça floresans yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir. Ancak SIF sıvısında partikül konsantrasyonu artması ile floresans intensiteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede artmamıştır. Ayrıca, tüm partikül konsantrasyonlarında ağız ortamından mide ortamına geçildikçe protein korona yapısının arttığı gözlemlenmektedir. Ancak mide ortamından bağırsak ortamına geçildikçe protein koronada dramatik bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu durumun nedeni, mide simülasyonunda parçalanmış proteinlerin, bağırsak simülasyonunda pankreatik enzimler ile küçük peptidlere parçalanması sayesinde protein koronanın incelendiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir [115]. Yağsız süt ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerinin floresans intensite sonuçları yağlı süt ile etkileştirilmiş d-PSMP örnekleri ile aynı trendde olduğu görülmüştür.

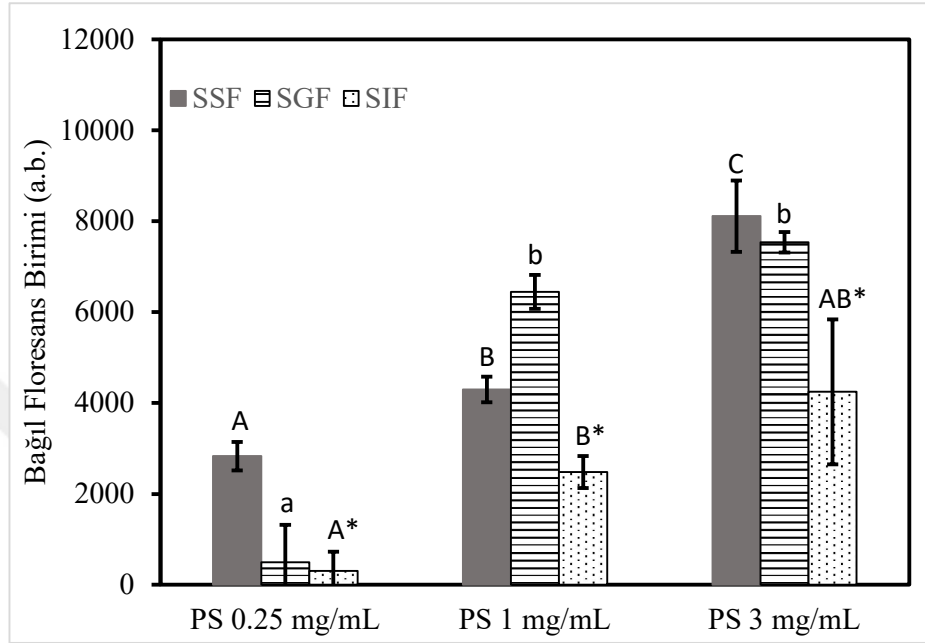


Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlardaki d-PSMP örneklerinin her bir sindirim sıvısından sonra alınan pelletlerin bağıl floresans intensiteleri gösterilmiştir. Farklı büyük harfler SSF, küçük harfler SGF ve *'lı harfler SIF içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p < 0.05$)



Şekil 4.18. Yağlı süt ile inkübe edilmiş farklı konsantrasyonlardaki d-PSMP örneklerinin her bir sindirim sıvısından sonra alınan pelletlerin bağıl floresans intensiteleri

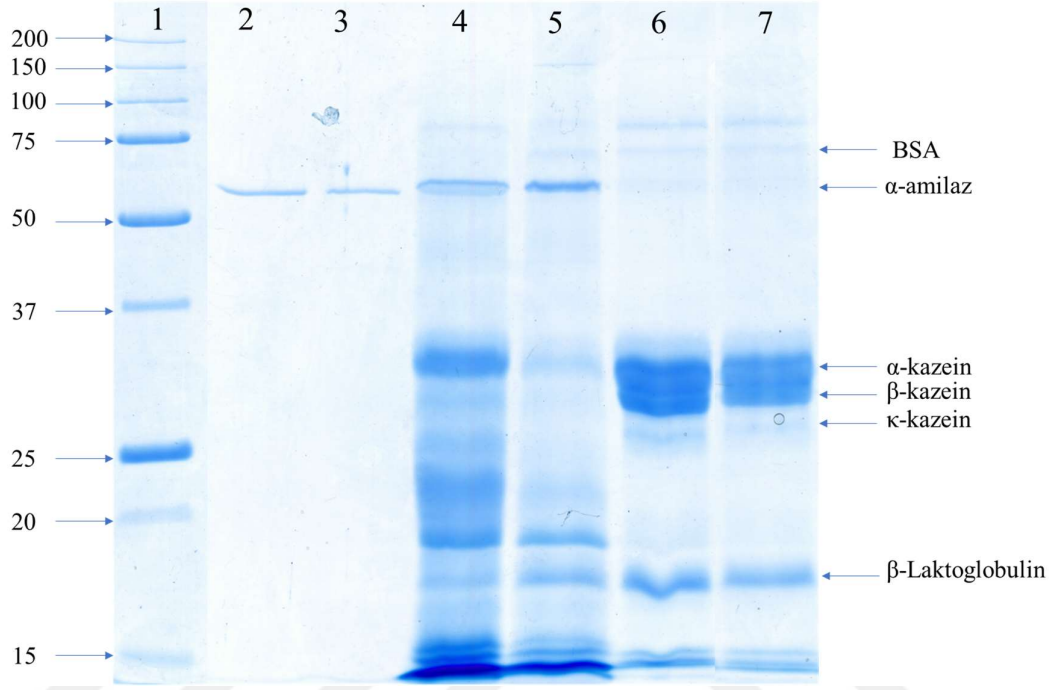
gösterilmiştir. Farklı büyük harfler SSF, küçük harfler SGF ve *'lı harfler SIF içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p<0.05$)



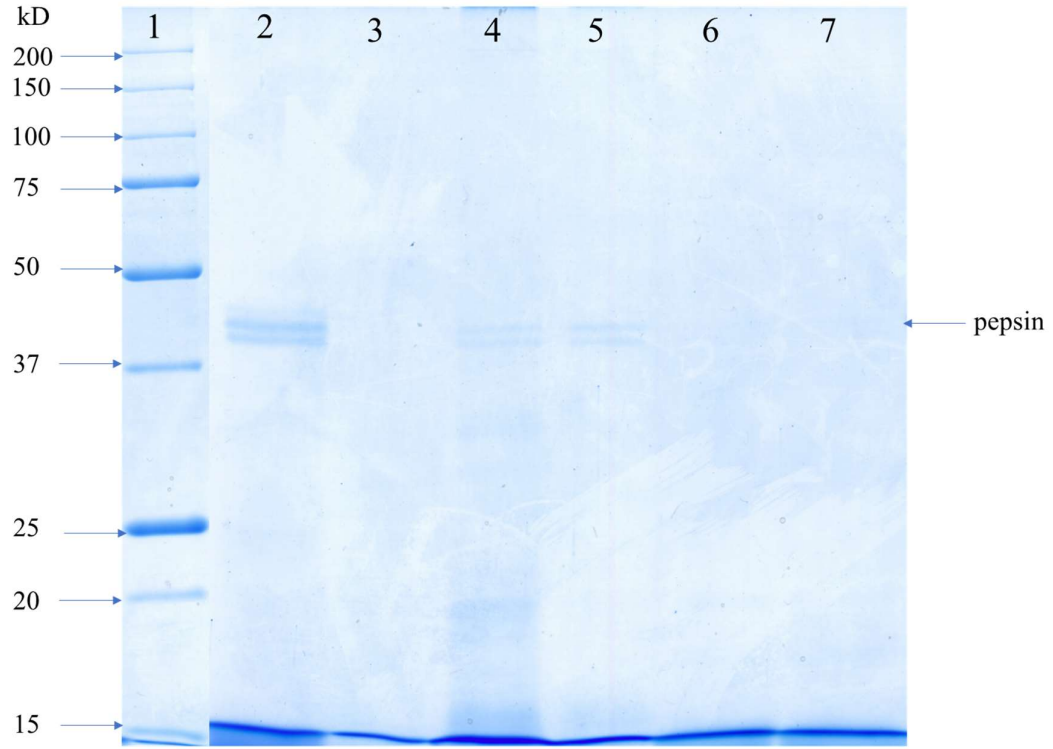
Şekil 4.19. Yağsız süt ile inkübe edilmiş farklı konsantrasyonlardaki d-PSMP örneklerinin her bir sindirim sıvısından sonra alınan pelletlerin bağlı floresans intensiteleri gösterilmiştir. Farklı büyük harfler SSF, küçük harfler SGF ve *'lı harfler SIF içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p<0.05$)

Sindirim simülasyonunun her bir aşamasında PSMP'lerin korona yapılarındaki proteinlerin tanımlanması için SDS-PAGE analizi uygulanmıştır. Bu doğrultuda, 3.00 mg/mL konsantrasyonundaki PSMP ve süt ile inkübe edilmiş PSMP'lere sindirim simülasyonu uygulanmıştır. Bu amaçla partiküller veya süt partikül karışımı inkübasyon sonrası 37 °C'de sırasıyla 5 dakika SSF ile 120 dakika SGF ile ve son olarak 120 dk SIF ile inkübe edilmiştir. Sindirim simülasyonu boyunca her bir sindirim sıvısı sonrasında örnekler alınmış ve partiküllerin ve protein korona yapılarının ortamdaki santrifüj ile ayrıştırılmıştır. SSF, SGF ve SIF sıvılarından sonra elde edilen pellet örnekleri örnek yükleme tamponu ile sırasıyla 100, 200 ve 400 kat derişik olacak şekilde çözdürülmüştür. Ardından deriştiren örnekler 90 °C'de 5 dakika boyunca denatüre edilmiş ve kuyulara yüklenip jeller 20 mA sabit akımda yürütülmüştür. Şekil 4.20.'de SSF ile muamele

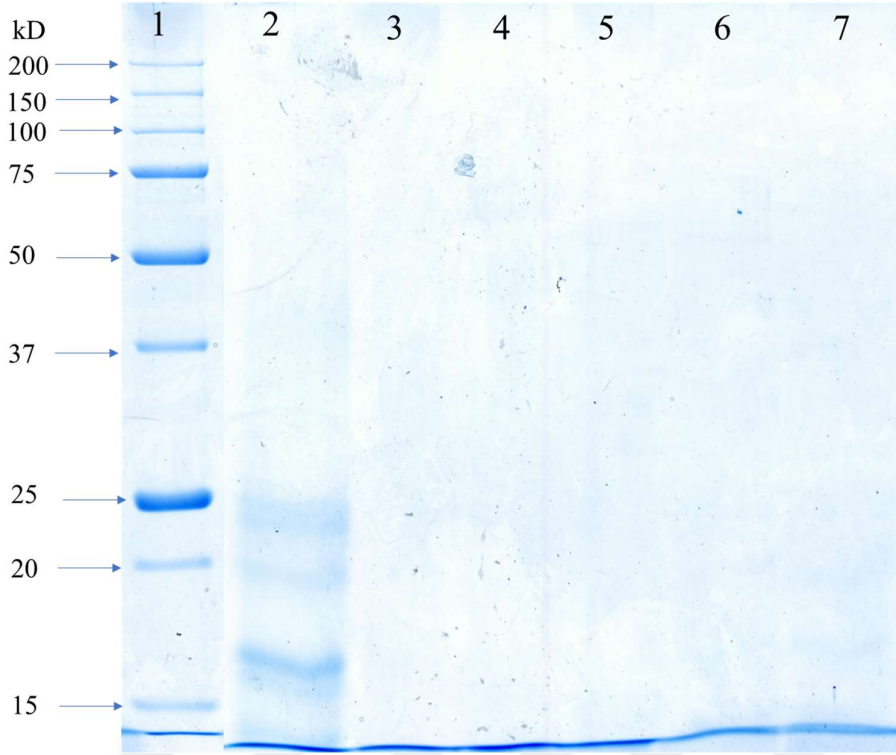
sonrasında PSMP'lere, Şekil 4.21.'de SGF ile muamele sonrasında ve Şekil 4.22.'de SIF ile muamele sonrasında PSMP'lere ait elektroforegramları verilmiştir.



Şekil 4.20. Sindirim simülasyonunda SSF ile muamele sonrası süt örnekleri, d-PSMP ve süt örnekleri ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerine ait elektroforegramı. 1:Belirteç; 2:SSF; 3: SSF + d-PSMP; 4: SSF + yağsız süt etkileştirilmiş d-PSMP 5: SSF + yağlı süt ile etkileştirilmiş PSMP; 6: SSF + 10 kat seyreltilmiş yağsız süt ; 7: SSF + 10 kat seyreltilmiş yağlı süt .



Şekil 4.21. Sindirim simülasyonunda SGF ile muamele sonrası süt örnekleri, d-PSMP ve süt örnekleri ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerine ait elektroforegramı. 1: Belirteç; 2: SGF; 3: SGF + d-PSMP; 4: SGF + yağsız süt ile etkileştirilmiş d-PSMP 5: SGF + yağlı süt ile etkileştirilmiş d-PSMP; 6: SGF + 10 kat seyreltilmiş yağsız süt; 7: SGF + 10 kat seyreltilmiş yağlı süt.



Şekil 4.22. Sindirim simülasyonunda SIF ile muamele sonrası süt örnekleri, d-PSMP ve süt örnekleri ile etkileştirilmiş d-PSMP örneklerine ait elektroforegramı. 1: Belirteç; 2:SIF; 3: SIF + d-PSMP; 4: SIF + yağsız süt etkileştirilmiş d-PSMP 5: SIF + yağlı süt ile etkileştirilmiş d-PSMP; 6: SIF + 10 kat seyreltilmiş yağsız süt; 7: SIF + 10 kat seyreltilmiş yağlı süt.

Süt örnekleri ile etkileştirilmemiş d-PSMP örneğinin ağız simülasyonu sonrası protein korona yapısı incelendiğinde sindirim sıvısında bulunan α -amilazın protein korona yapısında olduğu gözlemlenmiştir. Süt örnekleri ile etkileştirilen d-PSMP örneklerinin ağız simülasyonu sonrası protein korona yapıları incelendiğinde, süt proteinlerini bağladığı gözlemlenmiştir. Bunlar dışında sindirim ortamından gelen α -amilaz enzimini ve BSA'nın korona yapısında olduğu gözlemlenmiştir. d-PSMP örneklerinin mide simülasyonu sonrası protein korona yapıları incelendiğinde artık süt protein bantları gözükmemekte ve pepsin bandı gözükmemektedir. Bunun nedeni SGF içindeki pepsin enziminin süt proteinlerini küçük molekül ağırlıklı peptidlere parçalamasından kaynaklandığı düşünülmektedir [115]. Mide simülasyonu sonrası süt ile etkileştirilen d-PSMP örneklerinde pepsin bandı gözlemlenmişken süt ile etkileştirilmeyen d-PSMP örneklerinde pepsin bandı gözlemlenmemiştir. Bunun nedeni süt ile etkileştirilmemiş d-

PSMP'lerinde ortamda başka protein olmadığı için pepsinin kendini parçalamış olabileceği düşünülmüştür. Bağırsak simülasyonu sonrası hem süt ile etkileştirilmiş hem de süt ile etkileştirilmemiş d-PSMP örneklerinde protein bandına rastlanmamıştır. Bunun nedeni simülasyon sonunda sindirim enzimlerinin proteinleri parçaladığı ve kalan korona yapısının küçük peptidlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Martín-Hernández ve ark. [116] yapmış oldukları çalışmada, silikon dioksit nanopartikülleri ile etkileştirilmiş farklı gıda proteinleri sindirim simülasyonu boyunca incelenmiş ve sindirim simülasyonu sonunda silikon dioksit nanopartiküllerinin korona yapısında gıda örneklerine ait proteinlere rastlanmamıştır. Bu durum sindirim sonunda gıda proteinleri görmediğimizi desteklediği düşünülmektedir. Ayrıca, Wang ve ark. [42] yaptıkları çalışmada sindirim enzimleri ile polistiren partiküllerinin korona yapısı oluşturduğunu belirtmesi, çalışmamızda sindirim boyunca partiküllerin α -amilaz ve pepsin gibi sindirim enzimlerini protein korona yapısında görmemizi desteklemektedir.

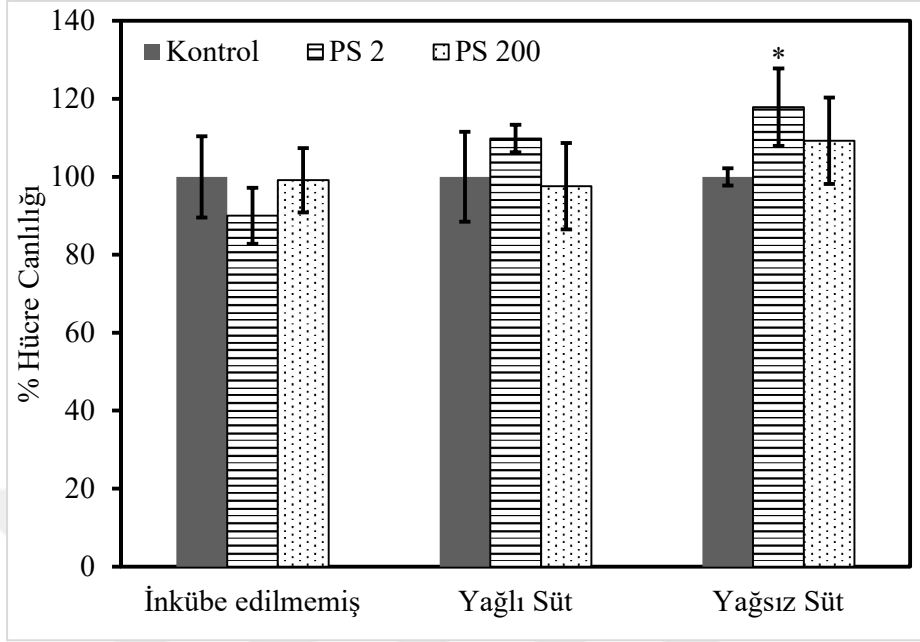
Sindirim simülasyonu sonuçlarına göre sütler ile etkileştirilmemiş d-PSMP örneklerinde sindirim sonunda floresans yoğunluğu arttığı gözlemlenmektedir. Bunun nedeni olarak sindirim sıvılarındaki protein ve enzim gibi biyomoleküllerin partiküller ile korona yapı oluşturduğu düşünülmektedir. Stock ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı mikropplastiklere *in-vitro* sindirim uygulanmış ancak aralarından en çok polistiren mikropplastığında organik bileşenler ile korona yapısı olduğu ve çapının arttığı gözlemlendiği belirtilmiştir [41]. Ayrıca, Wang ve ark. [42], yaptıkları çalışmada sindirim enzimleri olan α -amilaz, pepsin ve tripsinin polistiren partikülleri ile etkileşerek protein korona yapısı oluşturduğunu göstermiştir. Bu durumlar, çalışmamızda bulduğumuz sonucu desteklemektedir. Ancak süt ile etkileşmiş partiküllerde sindirim sonunda floresans yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni süt ile etkileştirilen partiküllerin hali hazırda partikül etrafında bir korona yapısının oluşturduğu ve sindirim süresince pepsin ve α -amilaz gibi enzimlerin korona yapısında bulunmasına rağmen bu korona yapısının sindirim sonunda parçalandığı ve azaldığı düşünülmektedir. Bağırsak simülasyonu sonrası d-PSMP'lerde floreskamin sonuçlarına göre floresans intensite tespit edilmesine rağmen jel görüntülerinde bantlar gözükmemektedir. Bu floresans intensiteye, jelin en altında gözükken veya jelden kaçmış olan küçük molekül ağırlıklı peptitlerin neden olduğu düşünülmektedir.

4.4. *In-vitro* Toksikite

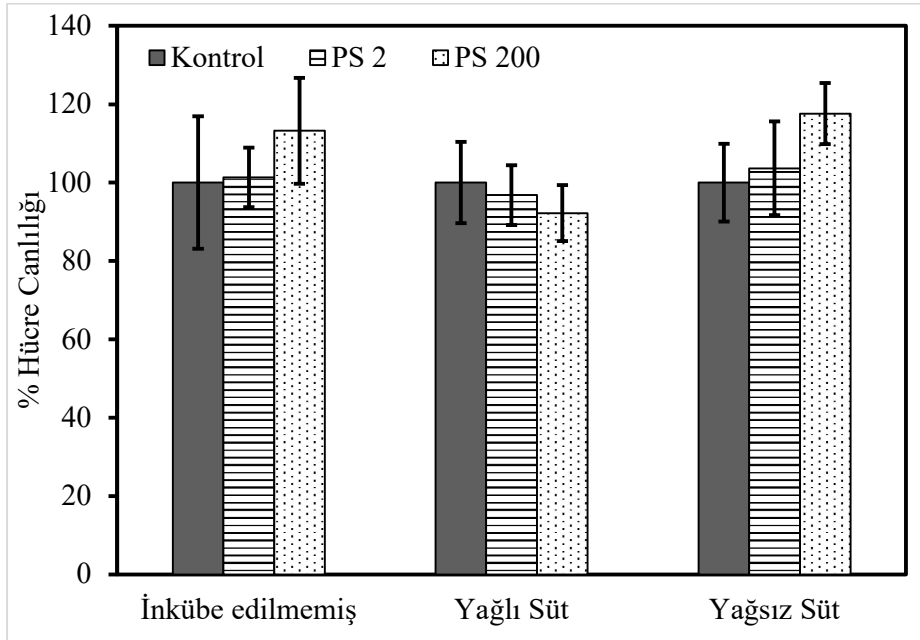
Bu tez çalışmasının son aşaması olarak gıda matrisleri ile inkübasyon sonrası sindirim simülasyonu uygulanmış ve gıda ile inkübe edilmeden sindirim simülasyonu uygulanmış PSMP'lerin sitotoksitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, bir bağırsak hücresi olan Caco-2 hücresi kullanılarak partiküllerin hücre canlılığı ve ROS oluşumu üzerine etkileri belirlenmiştir.

4.4.1. MTT ile Sitotoksikite Analizi

Gıda matrisi varlığının PSMP'lerin toksik özellikleri üzerine etkisinin belirlenebilmesi için, Caco-2 hücresi üstünde MTT ile canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yağlı süt ve yağsız süt ile etkileştirilen ve etkileştirilmeyen partiküllere sindirim simülasyonu uygulanmıştır. Daha sonra hazırlanan d-PSMP örnekleri ve sindirim simülasyonu uygulanmamış PSMP'ler hücre ile etkileşeceği son hacimde 2 ve 200 µg/mL olacak şekilde Caco-2 hücreleri ile 24 saat inkübe edilmiş ve MTT analizi uygulanmıştır. Kontrol olarak sindirilmemiş PSMP'lerde su, d-PSMP'lerde ise sindirim sıvısı kullanılmıştır. Şekil 4.23.'da PSMP'lerin, Şekil 4.24.'te d-PSMP'lerin ise hücre canlılığı üzerine etkisi gösterilmiştir. Analizler sonucunda sindirime uğramamış partiküllerin hücre canlılığı üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür. Literatürde Caco-2 hücreleri üzerinde farklı polistiren mikroplastikleri ile yapılan sitotoksikite çalışmalarında partiküllerin hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığını belirtmiştir [37, 117]. Ancak diğer yandan Stock ve ark. [118], farklı çaptaki polistiren mikroplastikleri ile ilgili yaptıkları çalışmada yüksek dozda 1 µm polistiren mikroplastiklerinin hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı olarak düşürdüğünü olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, gıda matrisinin varlığında da partiküllerin toksisitesinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. Sindirime uğramış partiküllerde de durum değişmemiş, ortamda gıda matrisinin varlığında ve yokluğunda hücre canlılığında önemli bir değişim görülmemiştir. Wu ve ark. [117] 5 µm polistiren mikroplastiklerinin Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksitesini ve transkriptomik profili incelenmiş. 10^{-1} - 10^{-8} mg/mL konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik maruziyet sonucu hücre canlılığının azaldığını ancak anlamlı derecede değişmediği belirtilmiştir. Literatürdeki bu sonuçlar göz önüne alındığında PSMP'lerin hücre canlılığında anlamlı derecede değişim gözlenmemesi şaşırtıcı değildir.



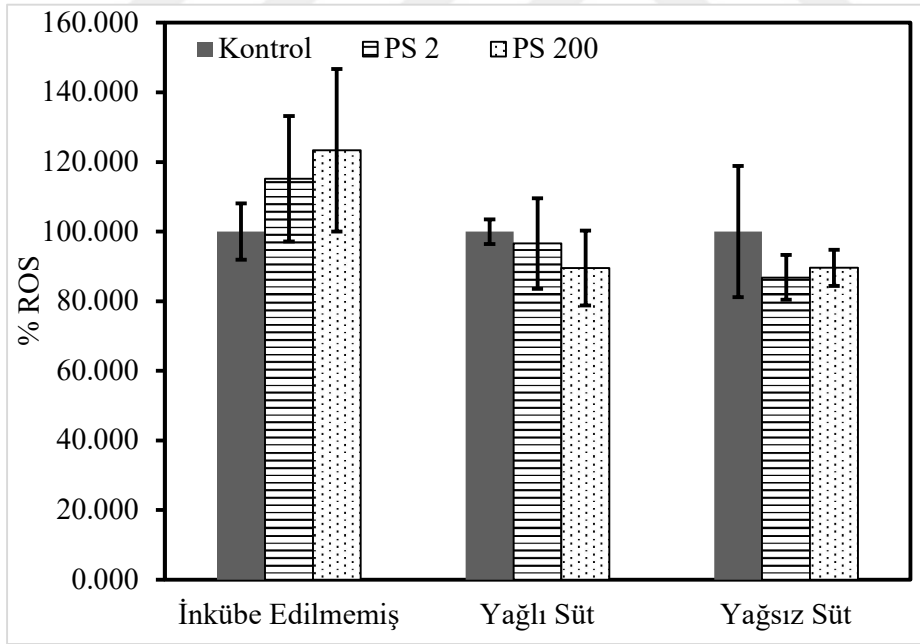
Şekil 4.23. PSMP ve yağlı ve yağsız süt ile etkileştirilmiş PSMP'lerin kendi kontrollerine göre % hücre canlılığı. * kendi grubundaki diğer örneklerden anlamlı olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$)



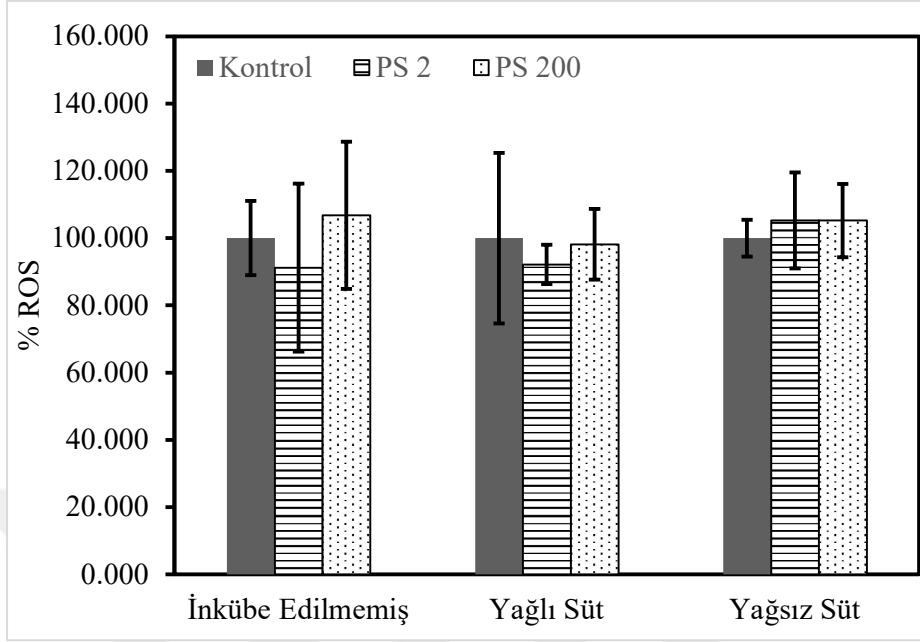
Şekil 4.24. d-PSMP ve yağlı ve yağsız süt ile etkileştirilmiş d-PSMP'lerin kendi kontrollerine göre % hücre canlılığını göstermektedir. Örnekler arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p < 0.05$)

4.4.2. Toplam ROS Ölçümü

ROS'lar moleküler oksijenden türetilen moleküller ve serbest radikallerdir [119] ve hücrel metabolizma sırasında ürettikleri bilinmektedir [120]. ROS'lar mitokondrideki elektron taşıma sistemi ve sitokrom P450 yoluyla metabolizmanın yan ürünleri olarak üretildiği gibi [119] inflamatuvar yanıtın oluşumunda rol alan fagosit ve endotel hücrelerinde bulunan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) enzimlerinin ürettiği [119, 121, 122]. Ancak yüksek konsantrasyonlar hücreye zarar verdikleri bilinmektedir. Zarar vermelerinin nedenlerinden biri proteinler ve lipitler gibi hücrel bileşenleri oksitler ve deoksiribo nükleik aside zarar vermesi yanında [119] hücre zarına da zarar verdiği [123] belirtilmiştir. d-PSMP ve PSMP'lerin indüklediği ROS üretimi DCFH-DA kullanılarak ölçülmüştür. Bu amaçla, d-PSMP ve PSMP'ler son hacimde 2 ve 200 µg/mL olarak ayarlanmış ve 24 saat Caco-2 hücreleri ile inkübe edildikten sonra ROS analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.25.'de d-PSMP'lerin Şekil 4.26.'de PSMP'lerin ROS seviyeleri yüzde kontrol olarak verilmiştir.



Şekil 4.25. PSMP ve yağlı ve yağsız süt örnekleri ile inkübe edilmiş PSMP'lerin kontrollerine göre %ROS değerleri. Kendi grubundaki örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).



Şekil 4.26. d-PSMP ve yağlı ve yağsız süt örnekleri ile inkübe edilmiş d-PSMP'lerin kontrollerine göre %ROS değerleri. Kendi grubundaki örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

Süt ile etkileştirilmemiş PSMP örneklerinde, konsantrasyon arttıkça, istatistiksel olarak anlamlı derecede olmasa da, %ROS'un arttığı gözlemlenmektedir. Wu ve ark. [37] polistiren nano- ve mikroplastikler ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki (1, 10, 40, 80, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 5 μm polistiren mikropartiküllerinin Caco-2 hücreleri üzerine 12 saatlik maruziyeti incelemişlerdir. Bu çalışma sonunda, partiküllerin hücre canlılığını değiştirmediği, ancak 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonundaki partiküllerin anlamlı derecede ROS oluşumunu indüklediği belirtilmiştir. PSMP örneklerinin aksine, süt ile etkileştirilen PSMP ve d-PSMP örneklerinde ise artış gözlemlenmemektedir. Liu ve ark. [74] polistiren partikülleri ile yaptıkları bir çalışmada, yapay sindirim simülasyonu sonucu partiküllerin etrafında oluşan protein korona yapısının partiküllerin indüklediği hücre zarı hasarını azalttığını belirtmiştir. Literatürde protein korona yapısının toksik etkileri azalttığı gösterildiği gibi, korona yapısı gözlemlenen PSMP ve d-PSMP örneklerinde ROS artışı olmaması partikül etrafındaki protein korona yapısından kaynaklandığı düşünölmektedir.

Özet olarak PSMP'lerin ve süt ile etkileştirilmiş PSMP'lerin Caco-2 hücrelerine üzerinde 24 saatlik maruziyeti sonucu hücre canlılığında anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu yüzden hücre canlılığı açısından protein koronanın etkisinden söz etmek anlamlı olmayacaktır. Ancak PSMP'lerin anlamlı derecede olmasa da kontrollerine göre ROS'un arttığı gözlemlenmektedir. Ancak protein korona bulunan d-PSMP, süt ile etkileştirilmiş PSMP ve d-PSMP örneklerinde bu artış gözlemlenmemiştir. Bu artışın gözlemlenmeme nedeni bu partiküllerdeki protein korona yapısı olduğu düşünülmüştür. d-PSMP örneklerinde toksisite ve yüksek ROS görülmemesinin nedeni partiküllerin oluşturduğu protein korona yapısı olduğu düşünülmektedir. Literatürdeki çalışmalar PSMP'lerin Caco-2 hücreleri üzerinde anlamlı derecede hücre canlılığını etkilemediği [37, 117], ancak ROS üretimini indüklediği [37] gösterilmiştir. Bunların yanı sıra yapılan başka bir çalışmada PSMP'lere yapılan sindirim uygulaması hücre hasarını azalttığı ve nedeninin protein korona yapısı olarak düşünüldüğü belirtilmiş [74]. Bu durum sonuçlardaki d-PSMP'lerin sitotoksik etki ve ROS'u indüklememesini desteklemektedir.

5. YORUM

Plastik kirliliği günümüzün vazgeçilmez sorunlarından biridir. Mikro boyutta üretilmiş olan plastik kirliliğinden veya daha büyük haldeki atık plastiklerin parçalanmasından oluşan mikropplastikler günümüzde endişe verici bir konu haline gelmiştir. Mevcut tez çalışması kapsamında, doğada ve çeşitli yiyecek ve içeceklerde bulunan mikropplastiklerden biri olan PSMP'in gerçek bir gıda ortamı ile etkileşimi; *in-vitro* sindirim simülasyonunun bu etkileşim üzerine etkisi ve sindirim simülasyonundan sonra partiküllerin *in-vitro* toksisiteleri incelenmiştir. Bu amaçla yağlı ve yağsız süt gıda matrisi olarak seçilmiştir. Sütün gıda matrisi olarak seçilmesinin amacı süt içinde temel gıda bileşenlerinin hepsinin bulunması ve HSS-FDA tarafından ilaç yararlanımı için önerilen diyetin fizikomikyasal özelliklerine benzemesidir. PSMP'lerin çeşitli biyolojik sıvılarda protein korona yapısı oluşturduğu çalışmalar literatürde bulunmaktadır [40-43, 71, 124]. Ancak yapılan literatür taramasında PSMP ile gerçek bir gıda ortamı arasındaki etkileşimini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. PSMP'ler ile bağırsak hücrelerinde yapılan *in-vitro* sitotoksikolojik çalışmalarda PSMP'ler doğrudan hücre ile etkileşime geçirilmiş [37, 117, 118, 125] veya PSMP'lere önceden sindirim simülasyonu uygulanmış ardından hücre ile etkileşime geçirilmiştir [74]. Ancak vücuda oral yol ile alınan mikropplastikler muhtemelen kontamine gıda ile alınacak ve sindirilecektir [85, 86, 89, 126]. Ancak bu *in-vitro* toksisite çalışmaları mikropplastiklerin gıda ortamı ile alındığı zamandaki toksisitesi hakkında bilgi vermemektedir. Bu tez çalışmasında PSMP'ler gıda ile etkileştirilmiş ardından *in-vitro* sindirim simülasyonu uygulanmış ve en sonunda Caco-2 hücreleri üzerinde sitotoksik çalışma yapılmış ve bu sayede gıda ortamı ile sindirilen PSMP'lerin bağırsak hücresi üzerindeki toksisitesi gerçeğe yakın bir şekilde incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, çeşitli konsantrasyonlarda PSMP'ler ile yağlı ve yağsız süt örnekleri etkileştirilerek gıda matrisi-PSMP etkileşiminin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla süt örnekleri ile farklı konsantrasyonlardaki PSMP'ler inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası partiküller santrifüj edilerek serbest gıda ortamından ayrıştırılmış ve üzerindeki korona yapısı analiz edilmiştir. Partikülün morfolojisi ve üzerindeki korona yapısının analizi için ESEM ve TEM gibi görüntü analizleri, partikülün yüzey yükü ve hidrodinamik çapı için DLS, koronadaki protein miktarının belirlenmesi için floreskamin etiketi ile florometrik analiz ve bu proteinlerin belirlenmesi için SDS-PAGE analizleri

geçekleştirilmiştir. Bu etkileşim partiküllerin net negatif yükünde azalmaya neden olsa da hidrodinamik çaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmayıp agregasyona neden olmamıştır. Ayrıca, sütteki belli proteinlerin PSMP'lerin yüzeyinde protein korona yapısı oluşturduğu gösterilmiştir. Bu korona yapısındaki proteinlerin partikül konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, korona yapısında çoğunlukla sütteki α ve β -kazein fraksiyonlarını bağladığı gözlemlenmiştir. Literatürde polistiren mikro partiküllerinin çeşitli proteinlerle beraber proteinleri adsorbladığı ve protein korona yapısı oluşturduğu gösterilmiştir [39-43]. Bu tez çalışmasında ilk defa polistiren mikroplastiklerinin gıda ortamı ile etkileşimi incelenmiş ve gıda ortamındaki gıda proteinini absorblayarak protein korona yapısı oluşturduğu gösterilmiştir. Literatürde partiküllerin lipitler ile etkileşime girdiği ve biyolojik ortamda oluşan korona yapısında yağlarında bulunduğu gösteren çalışmalar vardır [112, 127]. Ancak kullanılan gıda ortamındaki yağ miktarı protein bağlanmasını etkileyecek düzeyde olmadığı gözlemlenmiştir.

Polistiren partiküllerinin oral yol ile sindirim sistemine girmesinin muhtemelen bir gıda aracılığı ile olacağı [85] düşünüldüğü için, bu tez çalışmasında ilk kez gıda ortamı ile inkübe edilmiş PSMP'lere *in-vitro* sindirim simülasyonu uygulanmış ve sindirim partiküller üzerine etkisi incelenmiştir. Bu doğrultuda, yağlı ve yağsız süt örnekleri ile inkübe edilmiş PSMP'lere *in-vitro* sindirim simülasyonu uygulanmış ve sindirimin çalışmanın ilk aşamasında gösterilmiş olan protein korona yapısı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla d-PSMP'leri sırasıyla 37 °C'de 5 dakika boyunca SSF, 120 dakika boyunca SGF ve ardından 120 dakika boyunca SIF ile inkübe edilmiştir. Ardından her simülasyon sıvısı ardından örnekler alınıp analizler yapılmıştır. Bu analizler sonucu süt ile etkileştirilmiş d-PSMP'lerin sindirim sıvılarındaki biyomoleküller ile korona oluşturduğu, süt ile etkileştirilmiş d-PSMP'lerin yüzeyindeki korona tabakasının incelendiği, ancak hala bir korona yapısının bulunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca SSF ve SGF sindirim ortamında bu ortamların enzimlerinin de korona da bulunduğu gösterilmiştir. Literatürde yapılan araştırmalarda daha önce polistiren partiküllerinin sindirim enzimleri ile protein korona yapısı oluşturduğu [42] ve partiküllerin *in-vitro* sindirim simülasyonu ile korona yapısı oluşturduğu [41] belirtilmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında, PSMP ve d-PSMP'lerin Caco-2 hücresi üzerindeki toksikolojik etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, Caco-2 hücreleri 24 saat boyunca 2 ve 200

$\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundaki PSMP ve d-PSMP'ler ile inkübe edilmiştir. Ardından MTT analizi ile hücre canlılığı ve DCFH-DA kullanılarak da toplam ROS miktarı analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda hem düşük hem de yüksek konsantrasyonda PSMP'lerin hücre canlılığı ve ROS oluşumu üzerinde önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Mevcut tez çalışması ile bir mikroplastik olan PSMP'lerin karbonhidrat protein yağ gibi tüm gıda bileşenlerinin bulunduğu gerçek bir gıda ortamı ile etkileşimi incelenmiş. Bu inceleme sonunda PSMP'lerin gıda ortamında protein korona oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu korona yapısına sindirim simülasyonunun etkisi araştırılmıştır. Simülasyon süresince protein korona yapısında değişiklik olduğu ve azaldığı ancak tamamen elimine edilmediği belirtilmiştir. Son olarak PSMP'lerin Caco-2 hücreleri üzerinde toksisite oluşturmadıkları gösterilmiştir. Benzer şekilde gıda ortamıyla etkileştirilen PSMP'lerde de toksik özelliklerinde bir değişimin olmadığı görülmüştür. PSMP'lerin akut toksisitesi görülmemesine rağmen, kronik toksisitesi farklı olabilir. Çünkü mikroplastiklerin organlarda birikebileceğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur [26-31]. Ancak protein korona yapısı, hücresel emilimi değiştireceği için [128] partiküllerin kronik toksisitelerinde değişim görülebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Ananonim, Plastic-The Facts 2021, <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/> (Erişim Tarihi: **18 Mayıs 2022**)
- [2] D.K.A. Barnes, F. Galgani, R.C. Thompson, M. Barlaz, Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364 (2009) 1985-1998.
- [3] M.A. Browne, P. Crump, S.J. Niven, E. Teuten, A. Tonkin, T. Galloway, R. Thompson, Accumulation of Microplastic on Shorelines Woldwide: Sources and Sinks, *Environmental Science & Technology*, 45 (2011) 9175-9179.
- [4] Z. Akdogan, B. Guven, Microplastics in the environment: A critical review of current understanding and identification of future research needs, *Environmental Pollution*, 254 (2019) 113011.
- [5] A.L. Andrady, The plastic in microplastics: A review, *Marine Pollution Bulletin*, 119 (2017) 12-22.
- [6] G.F. Schirinzi, M. Llorca, R. Seró, E. Moyano, D. Barceló, E. Abad, M. Farré, Trace analysis of polystyrene microplastics in natural waters, *Chemosphere*, 236 (2019) 124321.
- [7] J. Gigault, A.t. Halle, M. Baudrimont, P.-Y. Pascal, F. Gauffre, T.-L. Phi, H. El Hadri, B. Grassl, S. Reynaud, Current opinion: What is a nanoplastic?, *Environmental Pollution*, 235 (2018) 1030-1034.
- [8] K. Zhang, A.H. Hamidian, A. Tubić, Y. Zhang, J.K.H. Fang, C. Wu, P.K.S. Lam, Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review, *Environmental Pollution*, 274 (2021) 116554.
- [9] A.L. Andrady, Microplastics in the marine environment, *Marine Pollution Bulletin*, 62 (2011) 1596-1605.
- [10] A. Cózar, F. Echevarría, J.I. González-Gordillo, X. Irigoien, B. Úbeda, S. Hernández-León, Á.T. Palma, S. Navarro, J. García-de-Lomas, A. Ruiz, M.L. Fernández-de-Puelles, C.M. Duarte, Plastic debris in the open ocean, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (2014) 10239.
- [11] G. Chen, Q. Feng, J. Wang, Mini-review of microplastics in the atmosphere and their risks to humans, *Science of The Total Environment*, 703 (2020) 135504.
- [12] W.J. Shim, R.C. Thomposon, Microplastics in the Ocean, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69 (2015) 265-268.
- [13] P.J. Anderson, S. Warrack, V. Langen, J.K. Challis, M.L. Hanson, M.D. Rennie, Microplastic contamination in Lake Winnipeg, Canada, *Environmental Pollution*, 225 (2017) 223-231.
- [14] E.K. Fischer, L. Paglialonga, E. Czech, M. Tamminga, Microplastic pollution in lakes and lake shoreline sediments – A case study on Lake Bolsena and Lake Chiusi (central Italy), *Environmental Pollution*, 213 (2016) 648-657.

- [15] X. Xiong, K. Zhang, X. Chen, H. Shi, Z. Luo, C. Wu, Sources and distribution of microplastics in China's largest inland lake – Qinghai Lake, *Environmental Pollution*, 235 (2018) 899-906.
- [16] M. Scheurer, M. Bigalke, Microplastics in Swiss Floodplain Soils, *Environmental Science & Technology*, 52 (2018) 3591-3598.
- [17] F. Corradini, P. Meza, R. Eguiluz, F. Casado, E. Huerta-Lwanga, V. Geissen, Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal, *Science of The Total Environment*, 671 (2019) 411-420.
- [18] S. Gündoğdu, C. Çevik, N.T. Ataş, Stuffed with microplastics: Microplastic occurrence in traditional stuffed mussels sold in the Turkish market, *Food Bioscience*, 37 (2020) 100715.
- [19] R. Akhbarizadeh, S. Dobaradaran, I. Nabipour, S. Tajbakhsh, A.H. Darabi, J. Spitz, Abundance, composition, and potential intake of microplastics in canned fish, *Marine Pollution Bulletin*, 160 (2020) 111633.
- [20] A. Karami, A. Golieskardi, C.K. Choo, V. Larat, S. Karbalaei, B. Salamatinia, Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats, *Science of The Total Environment*, 612 (2018) 1380-1386.
- [21] S. Gündoğdu, Contamination of table salts from Turkey with microplastics, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35 (2018) 1006-1014.
- [22] A. Karami, A. Golieskardi, C. Keong Choo, V. Larat, T.S. Galloway, B. Salamatinia, The presence of microplastics in commercial salts from different countries, *Scientific Reports*, 7 (2017) 46173.
- [23] M. Kedzierski, B. Lechat, O. Sire, G. Le Maguer, V. Le Tilly, S. Bruzard, Microplastic contamination of packaged meat: Occurrence and associated risks, *Food Packaging and Shelf Life*, 24 (2020) 100489.
- [24] B.E. Oßmann, G. Sarau, H. Holtmannspötter, M. Pischetsrieder, S.H. Christiansen, W. Dicke, Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water, *Water Research*, 141 (2018) 307-316.
- [25] L. Yin, H. Liu, H. Cui, B. Chen, L. Li, F. Wu, Impacts of polystyrene microplastics on the behavior and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*), *Journal of Hazardous Materials*, 380 (2019) 120861.
- [26] Y. Lu, Y. Zhang, Y. Deng, W. Jiang, Y. Zhao, J. Geng, L. Ding, H. Ren, Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver, *Environmental Science & Technology*, 50 (2016) 4054-4060.
- [27] N. Zitouni, N. Bousserrhine, O. Missawi, I. Boughattas, N. Chèvre, R. Santos, S. Belbekhouche, V. Alphonse, F. Tisserand, L. Balmassiere, S.P. Dos Santos, M. Mokni, H. Guerbej, M. Banni, Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*, *Journal of Hazardous Materials*, 403 (2021) 124055.
- [28] J. Wang, Y. Li, L. Lu, M. Zheng, X. Zhang, H. Tian, W. Wang, S. Ru, Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*), *Environmental Pollution*, 254 (2019) 113024.

- [29] P. Yu, Z. Liu, D. Wu, M. Chen, W. Lv, Y. Zhao, Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver, *Aquatic Toxicology*, 200 (2018) 28-36.
- [30] J.S. Choi, Y.-J. Jung, N.-H. Hong, S.H. Hong, J.-W. Park, Toxicological effects of irregularly shaped and spherical microplastics in a marine teleost, the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), *Marine Pollution Bulletin*, 129 (2018) 231-240.
- [31] L. Yin, B. Chen, B. Xia, X. Shi, K. Qu, Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacoever (*Sebastes schlegelii*), *Journal of Hazardous Materials*, 360 (2018) 97-105.
- [32] B. Li, Y. Ding, X. Cheng, D. Sheng, Z. Xu, Q. Rong, Y. Wu, H. Zhao, X. Ji, Y. Zhang, Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice, *Chemosphere*, 244 (2020) 125492.
- [33] R. Qiao, Y. Deng, S. Zhang, M.B. Wolosker, Q. Zhu, H. Ren, Y. Zhang, Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish, *Chemosphere*, 236 (2019) 124334.
- [34] C.-D. Dong, C.-W. Chen, Y.-C. Chen, H.-H. Chen, J.-S. Lee, C.-H. Lin, Polystyrene microplastic particles: In vitro pulmonary toxicity assessment, *Journal of Hazardous Materials*, 385 (2020) 121575.
- [35] J. Hwang, D. Choi, S. Han, J. Choi, J. Hong, An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells, *Science of The Total Environment*, 684 (2019) 657-669.
- [36] J.S. Choi, S.H. Hong, J.-W. Park, Evaluation of microplastic toxicity in accordance with different sizes and exposure times in the marine copepod *Tigriopus japonicus*, *Marine Environmental Research*, 153 (2020) 104838.
- [37] B. Wu, X. Wu, S. Liu, Z. Wang, L. Chen, Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells, *Chemosphere*, 221 (2019) 333-341.
- [38] C. Corbo, R. Molinaro, A. Parodi, N.E. Toledano Furman, F. Salvatore, E. Tasciotti, The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery, *Nanomedicine*, 11 (2015) 81-100.
- [39] S. Kihara, S. Ghosh, D.R. McDougall, A.E. Whitten, J.P. Mata, I. Köper, D.J. McGillivray, Structure of soft and hard protein corona around polystyrene nanoplastics—Particle size and protein types, *Biointerphases*, 15 (2020) 051002.
- [40] G. Liu, R. Jiang, J. You, D.C.G. Muir, E.Y. Zeng, Microplastic Impacts on Microalgae Growth: Effects of Size and Humic Acid, *Environmental Science & Technology*, 54 (2020) 1782-1789.
- [41] V. Stock, C. Fahrenson, A. Thuenemann, M.H. Dönmez, L. Voss, L. Böhmert, A. Braeuning, A. Lampen, H. Sieg, Impact of artificial digestion on the sizes and shapes of microplastic particles, *Food and Chemical Toxicology*, 135 (2020) 111010.
- [42] Y. Wang, M. Li, X. Xu, W. Tang, L. Xiong, Q. Sun, Formation of Protein Corona on Nanoparticles with Digestive Enzymes in Simulated Gastrointestinal Fluids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (2019) 2296-2306.

- [43] X. Li, E. He, K. Jiang, W.J.G.M. Peijnenburg, H. Qiu, The crucial role of a protein corona in determining the aggregation kinetics and colloidal stability of polystyrene nanoplastics, *Water Research*, 190 (2021) 116742.
- [44] R.J. Crawford, P.J. Martin, *Plastics Engineering*, 4th Edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, Chapter 1, 2020.
- [45] C.B. Crawford, B. Quinn, *Microplastic Pollutants*, Elsevier, Amsterdam, Chapter 1, 2017.
- [46] S.E.M. Selke, J.D. Culter, *Plastic Packaging*, Hanser, Munich, Chapter 2, 2016.
- [47] M. Cole, P. Lindeque, C. Halsband, T.S. Galloway, Microplastics as contaminants in the marine environment: A review, *Marine Pollution Bulletin*, 62 (2011) 2588-2597.
- [48] A.J. Peacock, A. Calhoun, *Polymer Chemistry*, Hanser, Munich, Chapter 1, 2006.
- [49] S.V. Canevarolo, *Polymer Science*, Hanser, Munich, Chapter 7, 2020.
- [50] S.V. Canevarolo, *Polymer Science*, Hanser, Munich, Chapter 9, 2020.
- [51] A.J. Peacock, A. Calhoun, *Polymer Chemistry*, Hanser, Munich, Chapter 2, 2006.
- [52] K. Kik, B. Bukowska, P. Sicińska, Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms, *Environmental Pollution*, 262 (2020) 114297.
- [53] C.B. Crawford, B. Quinn, *Microplastic Pollutants*, Elsevier, Amsterdam, Chapter 4, 2017.
- [54] C.B. Crawford, B. Quinn, *Microplastic Pollutants*, Elsevier, Amsterdam, Chapter 3, 2017.
- [55] L.W. McKeen, *Plastic Films in Food Packaging*, S. Ebnesajjad (Ed.), William Andrew, Oxford, Chapter 1, 2013.
- [56] C.B. Crawford, B. Quinn, *Microplastic Pollutants*, Elsevier, Amsterdam, Chapter 5, 217.
- [57] A.A. Horton, A. Walton, D.J. Spurgeon, E. Lahive, C. Svendsen, Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities, *Science of The Total Environment*, 586 (2017) 127-141.
- [58] A.J. Peacock, A. Calhoun, *Polymer Chemistry*, Hanser, Munich, Chapter 9, 2006.
- [59] M. Rochman *Chelsea*, Microplastics research—from sink to source, *Science*, 360 (2018) 28-29.
- [60] A. Winkler, N. Santo, M.A. Ortenzi, E. Bolzoni, R. Bacchetta, P. Tremolada, Does mechanical stress cause microplastic release from plastic water bottles?, *Water Research*, 166 (2019) 115082.
- [61] F. Du, H. Cai, Q. Zhang, Q. Chen, H. Shi, Microplastics in take-out food containers, *Journal of Hazardous Materials*, 399 (2020) 122969.
- [62] O.O. Fadare, B. Wan, L.-H. Guo, L. Zhao, Microplastics from consumer plastic food containers: Are we consuming it?, *Chemosphere*, 253 (2020) 126787.
- [63] L.M. Hernandez, E.G. Xu, H.C.E. Larsson, R. Tahara, V.B. Maisuria, N. Tufenkji, Plastic Teabags Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea, *Environmental Science & Technology*, 53 (2019) 12300-12310.

- [64] G.U. Nienhaus, P. Maffre, K. Nienhaus, *Methods in Enzymology* S.Y. Tetin (Eds.), Vol. 519, Academic Press, Cambridge, Chapter 4, **2013**.
- [65] S. Zanganeh, J.Q. Ho, M. Aieneravaie, M. Erfanzadeh, R. Spitler, *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications*, M. Mahmoudi and S. Laurent (Eds.), Elsevier, Amsterdam, Chapter 3, **2018**.
- [66] S. Zanganeh, R. Spitler, M. Erfanzadeh, A.M. Alkilany, M. Mahmoudi, *Protein corona: Opportunities and challenges*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 75 (**2016**) 143-147.
- [67] L. Treuel, G.U. Nienhaus, *Toward a molecular understanding of nanoparticle–protein interactions*, *Biophysical Reviews*, 4 (**2012**) 137-147.
- [68] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, S. Seal, *Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential*, *Biomaterials*, 28 (**2007**) 4600-4607.
- [69] M. Mahmoudi, I. Lynch, M.R. Ejtehadi, M.P. Monopoli, F.B. Bombelli, S. Laurent, *Protein–Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges*, *Chemical Reviews*, 111 (**2011**) 5610-5637.
- [70] R. García-Álvarez, M. Vallet-Regí, *Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials: Analysis and Relevance*, *Nanomaterials*, 11 (**2021**).
- [71] S. Kihara, N.J. van der Heijden, C.K. Seal, J.P. Mata, A.E. Whitten, I. Köper, D.J. McGillivray, *Soft and Hard Interactions between Polystyrene Nanoplastics and Human Serum Albumin Protein Corona*, *Bioconjugate Chemistry*, 30 (**2019**) 1067-1076.
- [72] X. Li, E. He, B. Xia, Y. Liu, P. Zhang, X. Cao, L. Zhao, X. Xu, H. Qiu, *Protein corona-induced aggregation of differently sized nanoplastics: impacts of protein type and concentration*, *Environmental Science: Nano*, 8 (**2021**) 1560-1570.
- [73] C. Vasti, D.A. Bedoya, R. Rojas, C.E. Giacomelli, *Effect of the protein corona on the colloidal stability and reactivity of LDH-based nanocarriers*, *Journal of Materials Chemistry B*, 4 (**2016**) 2008-2016.
- [74] S. Liu, X. Wu, W. Gu, J. Yu, B. Wu, *Influence of the digestive process on intestinal toxicity of polystyrene microplastics as determined by in vitro Caco-2 models*, *Chemosphere*, 256 (**2020**) 127204.
- [75] A. Sasidharan, J.E. Riviere, N.A. Monteiro-Riviere, *Gold and silver nanoparticle interactions with human proteins: impact and implications in biocorona formation*, *Journal of Materials Chemistry B*, 3 (**2015**) 2075-2082.
- [76] I. Radauer-Preiml, A. Andosch, T. Hawranek, U. Luetz-Meindl, M. Wiederstein, J. Horejs-Hoeck, M. Himly, M. Boyles, A. Duschl, *Nanoparticle-allergen interactions mediate human allergic responses: protein corona characterization and cellular responses*, *Particle and Fibre Toxicology*, 13 (**2016**) 3.
- [77] A. Sikora, A.G. Shard, C. Minelli, *Size and ζ -Potential Measurement of Silica Nanoparticles in Serum Using Tunable Resistive Pulse Sensing*, *Langmuir*, 32 (**2016**) 2216-2224.
- [78] H. Yang, M. Wang, Y. Zhang, X. Liu, S. Yu, Y. Guo, S. Yang, L. Yang, *Detailed insight into the formation of protein corona: Conformational change, stability and aggregation*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 135 (**2019**) 1114-1122.

- [79] X. Zhang, J. Zhang, F. Zhang, S. Yu, Probing the binding affinity of plasma proteins adsorbed on Au nanoparticles, *Nanoscale*, 9 (2017) 4787-4792.
- [80] S. Lindman, I. Lynch, E. Thulin, H. Nilsson, K.A. Dawson, S. Linse, Systematic Investigation of the Thermodynamics of HSA Adsorption to N-iso-Propylacrylamide/N-tert-Butylacrylamide Copolymer Nanoparticles. Effects of Particle Size and Hydrophobicity, *Nano Letters*, 7 (2007) 914-920.
- [81] M. Lundqvist, I. Sethson, B.-H. Jonsson, Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability, *Langmuir*, 20 (2004) 10639-10647.
- [82] A.A. Vertegel, R.W. Siegel, J.S. Dordick, Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme, *Langmuir*, 20 (2004) 6800-6807.
- [83] C. Carrillo-Carrion, M. Carril, W.J. Parak, Techniques for the experimental investigation of the protein corona, *Current Opinion in Biotechnology*, 46 (2017) 106-113.
- [84] M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggård, M.B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia, K. Dawson, The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study, *ACS Nano*, 5 (2011) 7503-7509.
- [85] J.C. Prata, J.P. da Costa, I. Lopes, A.C. Duarte, T. Rocha-Santos, Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects, *Science of The Total Environment*, 702 (2020) 134455.
- [86] M. Revel, A. Châtel, C. Mouneyrac, Micro(nano)plastics: A threat to human health?, *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1 (2018) 17-23.
- [87] P.A. Stapleton, Microplastic and nanoplastic transfer, accumulation, and toxicity in humans, *Current Opinion in Toxicology*, 28 (2021) 62-69.
- [88] L. Van Cauwenberghe, C.R. Janssen, Microplastics in bivalves cultured for human consumption, *Environmental Pollution*, 193 (2014) 65-70.
- [89] X. Yang, Y.B. Man, M.H. Wong, R.B. Owen, K.L. Chow, Environmental health impacts of microplastics exposure on structural organization levels in the human body, *Science of The Total Environment*, 825 (2022) 154025.
- [90] S. Tlili, D. Jemai, S. Brinis, I. Regaya, Microplastics mixture exposure at environmentally relevant conditions induce oxidative stress and neurotoxicity in the wedge clam *Donax trunculus*, *Chemosphere*, 258 (2020) 127344.
- [91] R. Qiao, C. Sheng, Y. Lu, Y. Zhang, H. Ren, B. Lemos, Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish, *Science of The Total Environment*, 662 (2019) 246-253.
- [92] K. Yin, Y. Wang, H. Zhao, D. Wang, M. Guo, M. Mu, Y. Liu, X. Nie, B. Li, J. Li, M. Xing, A comparative review of microplastics and nanoplastics: Toxicity hazards on digestive, reproductive and nervous system, *Science of The Total Environment*, 774 (2021) 145758.
- [93] S. Feng, Y. Zeng, Z. Cai, J. Wu, L.L. Chan, J. Zhu, J. Zhou, Polystyrene microplastics alter the intestinal microbiota function and the hepatic metabolism status in marine medaka (*Oryzias melastigma*), *Science of The Total Environment*, 759 (2021) 143558.

- [94] D. Lithner, Å. Larsson, G. Dave, Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition, *Science of The Total Environment*, 409 (2011) 3309-3324.
- [95] A. Banerjee, W.L. Shelver, Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review, *Science of The Total Environment*, 755 (2021) 142518.
- [96] F. Bertoli, D. Garry, M.P. Monopoli, A. Salvati, K.A. Dawson, The Intracellular Destiny of the Protein Corona: A Study on its Cellular Internalization and Evolution, *ACS Nano*, 10 (2016) 10471-10479.
- [97] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248-254.
- [98] Anonim, Türk Standartları Enstitüsü, Süt- Yağ Tayini- Gerber metodu (rutin metod), TS No. TS 8189, 1990.
- [99] Anonim, Türk Standartları Enstitüsü, İnek sütü-Çiğ, TS No. TS 1018, 2002.
- [100] M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D.J. McClements, O. Ménard, I. Recio, C.N. Santos, R.P. Singh, G.E. Vegarud, M.S.J. Wickham, W. Weitschies, A. Brodtkorb, A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus, *Food & Function*, 5 (2014) 1113-1124.
- [101] I.S. Sohal, Y.K. Cho, K.S. O'Fallon, P. Gaines, P. Demokritou, D. Bello, Dissolution Behavior and Biodurability of Ingested Engineered Nanomaterials in the Gastrointestinal Environment, *ACS Nano*, 12 (2018) 8115-8128.
- [102] A. Gómez-Hens, *Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd Edition, P. Worsfold, A. Townshend and C. Poole (Eds.), Elsevier, Oxford, FLUORESCENCE | Food Applications, 2005.
- [103] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [104] M.E. Kellett, P. Greenspan, R.B. Pegg, Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line, *Food Chemistry*, 244 (2018) 359-363.
- [105] E. Martinelli, D. Granato, L. Azevedo, J.E. Gonçalves, J.M. Lorenzo, P.E.S. Munekata, J. Simal-Gandara, F.J. Barba, C. Carrillo, M.S. Riaz Rajoka, L. Lucini, Current perspectives in cell-based approaches towards the definition of the antioxidant activity in food, *Trends in Food Science & Technology*, 116 (2021) 232-243.
- [106] H. Kim, X. Xue, Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining, *J Vis Exp*, (2020) 10.3791/60682.
- [107] Anonim, Türk Standartları Enstitüsü, Uzun Ömürlü Süt (UHT), TS No. TS 1192, 2001.
- [108] S. Li, H. Liu, R. Gao, A. Abdurahman, J. Dai, F. Zeng, Aggregation kinetics of microplastics in aquatic environment: Complex roles of electrolytes, pH, and natural organic matter, *Environmental Pollution*, 237 (2018) 126-132.

- [109] S. Lu, K. Zhu, W. Song, G. Song, D. Chen, T. Hayat, N.S. Alharbi, C. Chen, Y. Sun, Impact of water chemistry on surface charge and aggregation of polystyrene microspheres suspensions, *Science of The Total Environment*, 630 (2018) 951-959.
- [110] P. Suttiprasit, V. Krisdhasima, J. McGuire, The surface activity of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin: I. Surface tension measurements with single-component and mixed solutions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 154 (1992) 316-326.
- [111] C. Broyard, F. Gaucheron, Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge, *Dairy Science & Technology*, 95 (2015) 831-862.
- [112] H. Tan, T. Yue, Y. Xu, J. Zhao, B. Xing, Microplastics Reduce Lipid Digestion in Simulated Human Gastrointestinal System, *Environmental Science & Technology*, 54 (2020) 12285-12294.
- [113] C.B. Crawford, B. Quinn, *Microplastic Pollutants*, Elsevier, Amsterdam, Chapter 6, 2017.
- [114] P. Walstra, J.T.M. Wouters, T.J. Geurts, *Dairy Science and Technology*, 2nd Edition, CRC, Boca Raton, 2005.
- [115] Z. Ma, J. Bai, X. Jiang, Monitoring of the Enzymatic Degradation of Protein Corona and Evaluating the Accompanying Cytotoxicity of Nanoparticles, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7 (2015) 17614-17622.
- [116] M.d.C. Martín-Hernández, D. Burnand, C. Jud, R. Portmann, L. Egger, Interaction of magnetic silica nanoparticles with food proteins during in vitro digestion, *LWT*, 152 (2021) 112303.
- [117] S. Wu, M. Wu, D. Tian, L. Qiu, T. Li, Effects of polystyrene microbeads on cytotoxicity and transcriptomic profiles in human Caco-2 cells, *Environmental Toxicology*, 35 (2020) 495-506.
- [118] V. Stock, L. Böhmert, E. Lisicki, R. Block, J. Cara-Carmona, L.K. Pack, R. Selb, D. Lichtenstein, L. Voss, C.J. Henderson, E. Zabinsky, H. Sieg, A. Braeuning, A. Lampen, Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo, *Archives of Toxicology*, 93 (2019) 1817-1833.
- [119] L.H. Madkour, *Reactive Oxygen Species (ROS), Nanoparticles, and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Cell Death Mechanisms*, Academic Press, Cambridge, Chapter 2, 2020.
- [120] S.C.M. Pinho, M.A. Faria, A. Melo, E. Pinto, A. Almeida, R. Alves, A.R.J. Cabrita, A.J.M. Fonseca, I.M.P.L.V.O. Ferreira, Effect of skimmed milk on intestinal tract: Prevention of increased reactive oxygen species and nitric oxide formation, *International Dairy Journal*, 118 (2021) 105046.
- [121] B. Griffith, S. Pendyala, L. Hecker, P.J. Lee, V. Natarajan, V.J. Thannickal, NOX Enzymes and Pulmonary Disease, *Antioxidants & Redox Signaling*, 11 (2009) 2505-2516.
- [122] S.J. Forrester, D.S. Kikuchi, M.S. Hernandez, Q. Xu, K.K. Griendling, Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling, *Circulation Research*, 122 (2018) 877-902.
- [123] L. Baud, R. Ardaillou, Reactive oxygen species: production and role in the kidney, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 251 (1986) F765-F776.

- [124] O.O. Fadare, B. Wan, K. Liu, Y. Yang, L. Zhao, L.-H. Guo, Eco-Corona vs Protein Corona: Effects of Humic Substances on Corona Formation and Nanoplastic Particle Toxicity in *Daphnia magna*, *Environmental Science & Technology*, 54 (2020) 8001-8009.
- [125] J. Domenech, A. Hernández, L. Rubio, R. Marcos, C. Cortés, Interactions of polystyrene nanoplastics with in vitro models of the human intestinal barrier, *Archives of Toxicology*, 94 (2020) 2997-3012.
- [126] Z. Lett, A. Hall, S. Skidmore, N.J. Alves, Environmental microplastic and nanoplastic: Exposure routes and effects on coagulation and the cardiovascular system, *Environmental Pollution*, 291 (2021) 118190.
- [127] R. Coreas, X. Cao, G.M. DeLoid, P. Demokritou, W. Zhong, Lipid and protein corona of food-grade TiO₂ nanoparticles in simulated gastrointestinal digestion, *NanoImpact*, 20 (2020) 100272.
- [128] X. Cheng, X. Tian, A. Wu, J. Li, J. Tian, Y. Chong, Z. Chai, Y. Zhao, C. Chen, C. Ge, Protein Corona Influences Cellular Uptake of Gold Nanoparticles by Phagocytic and Nonphagocytic Cells in a Size-Dependent Manner, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7 (2015) 20568-20575.