

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**OTOFAJİ İNHİBİTÖRÜ CHLOROQUINE
UYGULAMASININ, İPEK BÖCEĞİ *BOMBYX MORI*
NİN LARVAL-PUPAL METAMORFOZ SÜRECİNDE,
POSTERİOR İPEK BEZİNE OLAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nurcan GÜRLER

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ

**Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Yüksek Lisans Programı**

**İzmir
2019**

Nurcan GÜRLER tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Otofaji inhibitörü chloroquine uygulamasının, ipek böceği *Bombyx mori*'nin larval-pupal metamorfoz sürecinde, posterior ipek bezine olan etkilerinin araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.03.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ

Raportör Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gamze TURGAY İZZETOĞLU

Üye : Prof. Dr. Güler ÜNAL

İmza

Ebru Göncü
Gamze Turgay İzzetoğlu

Güler Ünal

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Otofaji inhibitörü chloroquine uygulamasının, ipek böceği *Bombyx mori*'nin larval-pupal metamorfoz sürecinde, posterior ipek bezine olan etkilerinin araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08/ 03/ 2019

İmzası



Adı-Soyadı

Nurcan GÜRLER

ÖZET**OTOFAJİ İNHİBİTÖRÜ CHLOROQUINE UYGULAMASININ,
İPEK BÖCEĞİ *BOMBYX MORI*' NİN LARVAL-PUPAL METAMORFOZ
SÜRECİNDE, POSTERİOR İPEK BEZİNE OLAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

GÜRLER, Nurcan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ

Mart 2019, sayfa 47

Holometabol böceklerde larval-pupal metamorfoz sırasında larvaya özgü doku ve organların dejenerasyonu programlı hücre ölümü yolu ile gerçekleşmektedir. İpek böceği, *Bombyx mori*'de bulunan ve larvaya özgü bir doku olan posterior ipek bezinin dejenerasyonu, hemolenfteki ekdisteroid seviyesinin artışına bağlı olarak otofaji ve apoptoz mekanizmalarının birlikteliği ile meydana gelir. Posterior ipek bezi ile yapılan çalışmalarda, otofajik hücre ölümünün prepupal dönemde görüldüğü, apoptozisin ise pupa aşamasının erken safhasında meydana geldiği belirtilmektedir.

Yapılan çalışmada, larval-pupal metamorfoz sürecinde ipekböceği *Bombyx mori* posterior ipek bezinde otofajinin rolü araştırılmıştır. Bu amaçla, 5. larval evrenin 7. ve 8. günlerinde otofaji inhibitörü olan klorokuin iki farklı dozda uygulanmış ve posterior ipek bezine olan etkileri incelenmiştir. Uygulamalar sonrasında Bradford yöntemi ile posterior ipek bezindeki total protein miktarı ve lizozomal bir enzim olan asit fosfatazın aktivitesi belirlenmiştir. Hematoksilen & eozin boyama ile boyanan posterior ipek bezine ait kesitler ışık mikroskobu altında incelenerek larval-pupal metamorfoz sırasında posterior ipek bezinde meydana gelen morfolojik değişimler gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Bombyx mori*, posterior ipek bezi, klorokuin, programlı hücre ölümü.

ABSTRACT**INVESTIGATION THE EFFECTS OF AUTOPHAGY INHIBITOR
CHLOROQUINE IN POSTERIOR SILK GLAND OF SILKWORM
BOMBYX MORI, DURING LARVAL-PUPAL METAMORPHOSIS**

GÜRLER, Nurcan

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru GÖNCÜ

March 2019, pages 47

Remodeling or completely elimination of larvae-specific tissues and organs in holometabolous insects occur with programmed cell death during larval-pupal metamorphosis. The degeneration of the posterior silk gland, which is a larval-specific tissue in the silkworm, *Bombyx mori*, occurs with interaction of autophagy and apoptosis mechanisms due to an increase in the level of ecdysteroid in the hemolymph. Studies in the posterior silk gland showed that, while autophagic cell death occurs during prepupal stage, apoptosis is observed in the early phase of pupa stage.

In this study, the role of autophagy in silkworm, *Bombyx mori* posterior silk gland was investigated during larval-pupal metamorphosis. For this purpose, two different doses of chloroquine which is an autophagy inhibitor, was applied during the day 7 and 8 of the fifth larval stage and then its effects on posterior silk gland was examined. The total protein amounts of the posterior silk gland were determined by Bradford protein assay and the activities of the lysosomal enzyme acid phosphatase was detected. The posterior silk gland tissue sections which were stained with hematoxylin eosin were observed under light microscope and, morphological changes in the posterior silk gland during larval-pupal metamorphosis were shown.

Keywords: *Bombyx mori*, posterior silk gland, chloroquine, programmed cell death.

ÖNSÖZ

Programlı hücre ölümü (PHÖ), evrimsel açıdan korunmuş, genetik olarak kontrol edilen, çok hücreli canlılarda, doku homeostasisi, morfogenez ve hastalığa neden olan organizmalara karşı savunma gibi pek çok temel işlevde rol oynayan bir hücresel mekanizmadır. Son yıllarda farklı hücre ölüm mekanizmaları arasındaki bağlantıların anlaşılması ve kanser gibi hastalıkların tedavisi ile ilişkilendirilmesi üzerine birçok çalışma yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, ipek böceği, *Bombyx mori*'nin posterior ipek bezinde, larval-pupal metamorfoz sırasında gerçekleşen dejenerasyonda, otofaji inhibisyonu ile otofajinin rolünün belirlenmesi ve apoptotik süreç üzerindeki muhtemel etkilerinin gözlenmesi hedeflenmiştir.

Özellikle tez konusunun belirlenmesinde isteklerimi göz önünde bulundurup beni yönlendiren, değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyerek çalışmamla yakından ilgilenen sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

08/03/2019

Adı-Soyadı

Nurcan GÜRLER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 İpek Böceği (<i>Bombyx mori</i>)	1
1.2 Böcek Metamorfozu ve Endokrin Sistem	2
1.3 İpek Bezi	4
1.4 Programlı Hücre Ölümü	6
1.5 Otofaji İnhibitörü	9
2. GEREÇ VE YÖNTEM	12
2.1 Deney Hayvanlarının Yetiştirilmesi	12
2.2 Deneyde Kullanılan Otofaji İnhibitörü	12
2.3 Posterior İpek Bezinin Elde Edilmesi	13
2.4 Histolojik Analizler	14
2.5 Biyokimyasal Analizler	16
2.5.1 Total Protein Miktarının Belirlenmesi	16
2.5.2 Asit Fosfataz Enzim Analizi	16
2.6 İstatistik	18
3. BULGULAR	19
3.1 Histolojik Bulgular	19
3.2 Asit Fosfataz Enzim Analizi Bulguları	28
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
KAYNAKLAR DİZİNİ	39

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

TEŞEKKÜR46

ÖZGEÇMİŞ.....47



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. İpek böceği (<i>B.mori</i>)' nin yaşam döngüsü. Yumurta safhası, larva safhası, pupa safhası ve ergin safha	2
1.2. <i>Bombyx mori</i> ipek bezi	4
1.3. Otofagozom ve otolizozomun şekillenmesi	8
3.1. İpek böceği <i>Bombyx mori</i> 'de larval-pupal metamorfoz sırasında, 5. instar kontrol grubu, 7. gün 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulamaları sonrasında posterior ipek bezinde meydana gelen morfolojik değişimlerin genel görüntüsü.....	22
3.2. İpek böceği <i>Bombyx mori</i> 'de larval-pupal metamorfoz sırasında, 5. instar kontrol grubu, 7. gün 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulamaları sonrasında posterior ipek bezinde meydana gelen morfolojik değişimlerin ayrıntılı görüntüsü... ..	23
3.3. İpek böceği <i>Bombyx mori</i> 'de larval-pupal metamorfoz sırasında, 5. instar kontrol grubu, 8. gün 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulamaları sonrasında posterior ipek bezinde meydana gelen morfolojik değişimlerin genel görüntüsü.....	26
3.4. İpek böceği <i>Bombyx mori</i> 'de larval-pupal metamorfoz sırasında, 5. instar kontrol grubu, 8. gün 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulamaları sonrasında posterior ipek bezinde meydana gelen morfolojik değişimlerin ayrıntılı görüntüsü.....	27
3.5. İpek böceği <i>Bombyx mori</i> , 5. instar 7. gün 1 mg klorokuin uygulaması sonucu enzim aktiviteleri	28
3.6. İpek böceği <i>Bombyx mori</i> , 5. instar 7. gün 3 mg klorokuin uygulaması sonucu enzim aktiviteleri	29

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- 3.7. İpek böceği *Bombyx mori*, 5. instar 8. gün 1 mg klorokuin uygulaması sonucu enzim aktiviteleri..... 30
- 3.8. İpek böceği *Bombyx mori*, 5. instar 8. gün 3 mg klorokuin uygulaması sonucu enzim aktiviteleri..... 30



1. GİRİŞ

1.1 İpek Böceği (*Bombyx mori*)

Salgıladıkları ipek ile önemli ekonomik ve ticari değeri bulunan ipek böcekleri (*Bombyx mori*), 5000 yıldan fazla ipek üretiminde kullanılmaktadır. Özellikle Çin, Hindistan, Japonya ve Tayland gibi ülkelerde ipek böceği yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmakta; bundan dolayı bu ülkelerde ipek böceği yetiştirilen çiftlikler bulunmaktadır (Hou et al., 2007).

İpek böcekleri özellikle günümüzde boyutlarının büyük olması ve kültürlerinin laboratuvar ortamında kolay yapılabilmesinden dolayı Lepidoptera ve Arthropoda biyolojisi ile ilgili bilimsel çalışmalarda model organizma olarak sıklıkla tercih edilmektedir (Goldsmith et al., 2004).

Arthropoda şubesinin Insecta sınıfının Pterygota alt sınıfı içerisinde yer alan ipek böceklerinin sistematikteki yeri Parker' ın 1982'de yayınladığı "Synopsis and Classification of living Organisms" adlı esere göre şu şekilde belirtilmektedir;

Şube : Arthropoda

Sınıf : Insecta

Alt sınıf : Pterygota

Üst takım : Holometabola

Takım : Lepidoptera

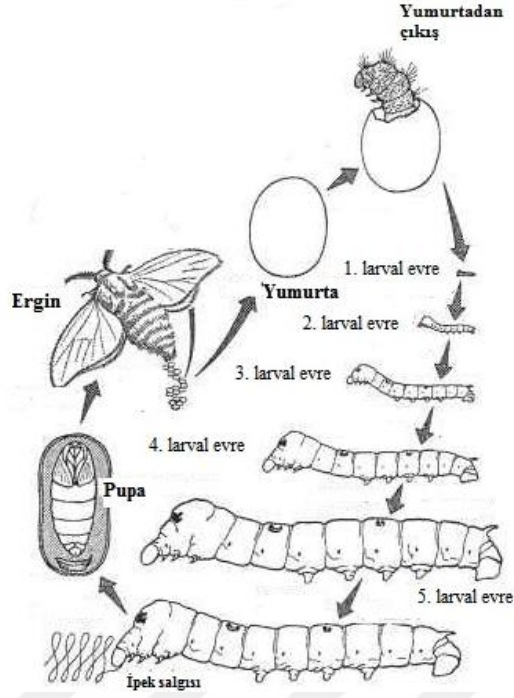
Üst aile : Bombycoidae

Aile : Bombycidae

Cins : Bombyx

Tür : *Bombyx mori*

İpek böcekleri holometabol böcekler olup yaşam döngüleri yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere fizyolojik ve morfolojik özellikleri birbirinden farklı dört safhadan meydana gelmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 İpek böceği (*B.mori*)'nin yaşam döngüsü. Yumurta safhası, larva safhası, pupa safhası ve ergin safha (Parlak, 2001).

Yumurtadan çıkan larvalar dört kez larval deri değiştirerek pupal safhaya, daha sonrasında ise pupal-ergin deri değişimi gerçekleştirerek ergin safhaya geçerler. Holometabol böceklerde meydana gelen tüm metamorfik işlemler endokrin sistem tarafından düzenlenmektedir (Sakurai and Imokawa, 1988).

1.2 Böcek Metamorfozu ve Endokrin Sistem

Böceklerde deri değiştirme ve metamorfoz olayları esas olarak 20-hidroksiekdizon (20E) ve juvenil hormon (JH) tarafından düzenlenmektedir (Tian et al., 2010).

Beyinde bulunan nörosekresyon hücreleri tarafından sentezlenen protorasikotropik hormon (PTTH), larval ve pupal dönemde ekdizonun salınması için protorasik bezi uyarmaktadır. Protorasik bezden hemolenfe salınan ekdizon inaktif formda olup aktif form olan 20 hidroksiekdizon (20E)'a dönüştürülmektedir (Gullan et al., 2010). 20E steroid yapıda bir hormondur. 20-hidroksiekdizon ile yapılan çalışmalarda, hemolenfte bulunan yüksek 20E seviyesinin pupal metamorfozu uyardığı ve larval dokularda programlı hücre ölümünü başlattığı belirtilmektedir (Terashima et al., 2000; Kakei et al., 2005).

Drosophila larval tükürük bezinde yapılan bir çalışmada, bu bezde meydana gelen dejenerasyonun ekdizon bağlantılı olup olmadığını göstermek için prepupal tükürük bezi 7 saat boyunca ekdizon ile kültüre edilmiş ve sonrasında akrinin orange ile boyanmıştır. Kontrol grubu ise ekdizon yokluğunda 7 saat boyunca kültüre edilmiş ve sonrasında boyama gerçekleştirilmiştir. Ardından yapılan gözlemlerde kontrol grubunda herhangi bir nükleer boyanma meydana gelmezken ekdizon ile kültüre edilmiş grupta güçlü bir nükleer boyanmanın meydana geldiği görülmüştür. Tükürük bezine ek olarak benzer çalışma orta bağırsak için yapılmış ve ekdizon ile kültürü yapılan dokularda ekdizona cevap olarak programlı hücre ölümünün meydana geldiği, kontrol grubunda ise bu durumun gözlemlenmediği belirtilmiştir (Jiang et al., 1997). *Manduca sexta* ile yapılan diğer bir çalışmada da, labial bezde 20E'nun hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Halaby et al., 2003).

Böceklerde bulunan ve ekdizona antagonist olarak aktivite gösteren juvenil hormon (JH), metamorfoz, üreme, diyapoz ve diğer fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (International Silkworm Genome Consortium, 2008). JH farklı gelişimsel etkilere sahip olmasına rağmen asıl rolü ekdisteroidlerin etkisini düzenlemektir (Dubrovsky, 2005).

Juvenil hormon (JH), hem peptid hem de steroid yapıda olup; corpora allata tarafından salgılanmaktadır. Hemolenfte bulunan JH, PTH'in salınımını engelleyerek larval evrelerin normalden uzun sürmesine ve deri değişiminin engellenmesine neden olmaktadır (İzzetoğlu ve ark., 2009). Ekdisteroidler deri değişiminin süresini ve başlangıcını düzenlerken, JH deri değişiminin karakterini belirlemektedir. Hemolenfte JH varlığında larval-larval deri değişimi gerçekleşirken, son larval safhada JH'nun gittikçe azalması ve hemolenfte belirlenemez seviyeye düşmesi ile birlikte larval-pupal, pupal-ergin deri değişimi gerçekleşmektedir (Riddiford, 1985; Kamimura and Kiuchi, 1998; Dubrovsky, 2005; Göncü, 2006).

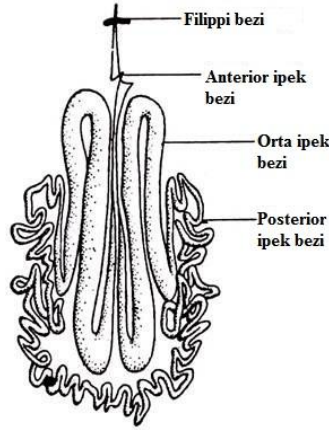
Juvenil hormonun moleküler mekanizması ve etkileri henüz netlik kazanmasa da, programlı hücre ölümü ile ilgili yapılan çalışmalarda JH'nun hücre ölümünü geciktirdiği ya da baskıladığı bulunmuştur. *Galleria mellonella* ipek bezinde yapılan çalışmada, ipek bezinde meydana gelen programlı hücre

ölümünün juvenil hormon ile engellendiği gösterilmiştir (Grzelak and Szczesna, 1982). Dai and Gilbert (1998), *Manduca sexta* protorasik bezinde yaptıkları çalışmada, pupa-ergin gelişimi sırasında protorasik bezde meydana gelen programlı hücre ölümünün juvenil hormon tarafından geciktirilebildiğini göstermişlerdir (Dai and Gilbert, 1998). Göncü (2006), yaptığı çalışmada, *Bombyx mori* anterior ipek bezinde meydana gelen programlı hücre ölümünün, juvenil hormon analogu fenoksikarb tarafından engellendiğini bildirmiştir (Göncü, 2006).

1.3 İpek Bezi

İpek böceği, *Bombyx mori*'de bulunan ipek bezi larvaya özgü bir dokudur ve ventral bölgede bir çift olarak bulunmaktadır. İpek bezi üç tabakadan meydana gelmektedir: Dışta tunika propria, ortada ipek proteinlerini üreten hücrelerin bulunduğu tabaka ve içte tunika intima bulunmaktadır. İpek bezi hücreleri dallanmış nukleusları ile ayırt edilmektedir (Parlak, 2001).

Ektoderm orjinli olan ipek bezi, morfolojik ve işlevsel olarak anterior ipek bezi, orta ipek bezi ve posterior ipek bezi olmak üzere üç kısma ayrılmaktadır (Şekil 1.2) (Parlak, 2001).



Şekil 1.2 *Bombyx mori* ipek bezi.

(http://cdn.biologydiscussion.com/wp-content/uploads/2016/05/clip_image006-128.jpg)

Anterior ipek bezi yaklaşık 2 cm uzunluğunda, ortalama 250 hücreden oluşan ve ince bir tüp formundadır. İpeğin çıkışı bu ince tüpden sağlanmaktadır. Anterior ipek bezinin bilinen herhangi bir salgı işlevi yoktur. Orta ipek bezi yaklaşık 7 cm uzunluğunda, ipek bezinin en büyük ve en geniş kısmını

oluşturmakta ve ortalama 300 hücreden meydana gelmektedir. Orta ipek bezi hücreleri ipeğin esas yapısından birini oluşturan serisin proteinini üretmektedir. Posterior ipek bezi ise yaklaşık 15 cm uzunluğunda, ucu kapalı ve ortalama 500 hücreden oluşan kısımdır (Parlak, 2001; Mondal, 2007). Posterior ipek bezi hücreleri ipek salgısının esas maddesini oluşturan fibroin proteinini sentezlemektedir. 5. larval instar sırasında salgılanan fibroin proteini glisin, alanin, serin ve tirozin gibi aminoasitler bakımından zengindir (Tashiro, 1968). Fibroin proteini orta bölgede bulunan serisin ile çevrelenerek anterior kısmından dışarı doğru salgılanır ve böylece ipek salgısı oluşturulur.

Metamorfoz sırasında larval organların dejenerasyonu, Lepidoptera takımının ortak özelliğidir. Gelişim aşamasında çoğu doku ve organların yeniden oluşturulması ya da tamamen ortadan kaldırılması metamorfoz sürecinde gerçekleşmektedir (Montali et al., 2017). Larvaya özgü bir doku olan ipek bezinin gelişimsel özellikleri hormonlar tarafından kontrol edilmekte ve koza örme işlemi tamamlandıktan sonra prepupal dönemde hemolenfteki ekdisteroid seviyesinin artışına bağlı olarak programlı hücre ölümü ile dejenere olmaktadır (Tsuzuki et al., 2001). *Bombyx mori* posterior ipek bezinin dejenerasyonu, 20E tarafından tetiklenen programlı hücre ölümü ile gerçekleşmektedir. Posterior ipek bezi ile yapılan çalışmalarda, ipek bezi dejenerasyonunun otofaji ve apoptoz mekanizmaları ile gerçekleştiği, otofajinin apoptozdan önce, koza örme aşamasında meydana geldiği ve diğer gelişimsel aşamalar boyunca aktif kaldığı, apoptozisin ise posterior ipek bezinin tamamen dejenere olmasından hemen önce, pupa aşamasının erken safhasında meydana geldiği belirtilmiştir. Bunun yanında yapılan çalışmalarda otofaji ve apoptozun aktifleşme zamanlarının ve oynadıkları rollerin ilgili organa bağlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Buna göre, orta bağırsakta meydana gelen programlı hücre ölümünde, otofaji apoptozdan 24-48 saat önce gerçekleşirken, yağ dokusunda ise apoptoz otofajiden 48-72 saat önce gerçekleşmektedir (Montali et al., 2017).

1.4 Programlı Hücre Ölümü

Programlı hücre ölümü (PHÖ), çok hücreli canlılarda, doku homeostasisi, morfogenez ve hastalığa neden olan organizmalara karşı savunma gibi birçok temel işlevde rol oynamaktadır. Ayrıca evrimsel açıdan korunmuş, genetik olarak kontrol edilen bir mekanizmadır (Karadağ, 2016). PHÖ hayvan gelişiminde, kurbağa larvalarında kuyruk, solungaç gibi işlevini yitiren yapıların ortadan kaldırılmasında, embriyonik dönemde parmak aralarının şekillenmesinde, eşey organlarının farklılaşmasında ve organ-doku boyutlarının belirlenmesinde rol oynamakta olup bunun yanında hücre bölünmesiyle artan hücre sayılarının kontrol edilmesinde, zararlı, işlevsiz hücrelerin ortadan kaldırılmasında da görev almaktadır (Jacobson et al., 1997; Göncü, 2006).

Holometabol böceklerde larvaya özgü dokular, larval-pupal metamorfoz sürecinde programlı hücre ölümü ile dejenere olmaktadır. Tükrük bezleri, motor nöronlar, segmentler arası kaslar, protorasik bezler ve ipek bezleri bu dokulara örnek olarak verilmektedir. Bu dejenerasyon sürecinde hem apoptotik hücre ölümünün hem de otofajik hücre ölümünün rol oynadığı bildirilmiştir (Terashima et al., 2000; Kakei et al., 2005).

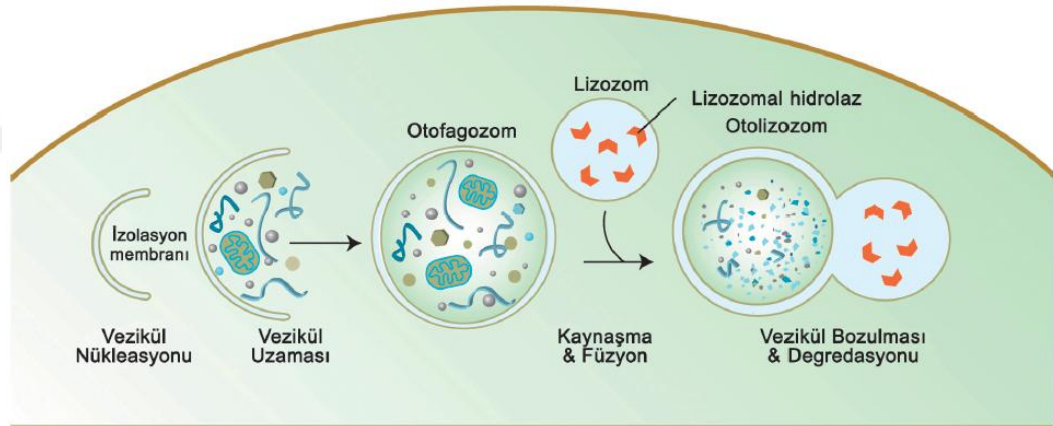
Otofaji katabolik bir süreç olup hücre içi makro moleküllerin, hasar görmüş organellerin, hatalı oluşan, işlevsiz ve uzun ömürlü proteinlerin bir kese içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşmesi sonucu parçalanmasına neden olan genetik olarak programlanmış ve evrimsel olarak korunmuş bir hücresel geri dönüşüm mekanizmasıdır (Arslan ve ark., 2011; Donohue et al., 2011; Badadani, 2012). Başta besin açlığı olmak üzere büyüme faktörlerinin eksikliği, radyasyon, endoplazmik retikulum stresi, kemoterapötik maddeler, hipertermi, ve hipoksi gibi çeşitli stres ve fizyolojik koşullara tepki olarak otofaji mekanizması aktive edilmektedir (Badadani, 2012; Sahin ve Yıldız, 2017). Otofaji ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda, otofajinin, açlık durumlarında besin ve enerji elde etmek için hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağladığı, böylece hücrenin stres koşullarına uyumuna yardım ettiği, ve bu sayede de hücre homeostazisinin korunmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Arslan ve ark., 2011). Sonraki araştırmalarda otofajinin, hücrenin hayatta kalması, hücre ölümü, hücre farklılaşması, yaşlanma, metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis ve

doğal bağışıklık gibi birçok fizyolojik ve gelişimsel süreçlerde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak, hücrenin hayatta kalmasını sağlayan otofaji ile hücre ölümüne sebep olan otofajik hücre ölümü arasındaki bağlantı henüz netlik kazanmamıştır. Bunun yanında, otofajide meydana gelen anormalliklerin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer ve Huntington) gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Arslan ve ark., 2011; Tian and Li, 2015).

Otofaji üç ayrı mekanizma ile meydana gelmektedir. Bunlar; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofajidir. Makrootofaji, bu çalışmanın temelini oluşturan ve bahsi geçen otofajidir. Otofajinin moleküler mekanizması ilk olarak tomurcuklanan bir maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae*'deki yapılan çalışmalarda tanımlanmış ve bu çalışmalar ile bugüne kadar 40'dan fazla otofaji ile ilişkili (*Atg*) genin rol oynadığı tespit edilmiştir (Sahin ve Yıldız, 2017). *Bombyx* 'te yapılan çalışmalarda ise *Atg1*'in en az iki transkript varyantı dahil, toplamda 14 otofaji ilişkili genin (*Atg*) bulunduğu gösterilmiştir (Tian and Li, 2015).

Otofaji sürecinde, açlık gibi stres sinyalleri sonrasında meydana gelen ilk olay çift zarlı otofagozomun şekillenmesidir. Otofagozomun şekillenmesi bazı *Atg* proteinleri ile gerçekleşmekte ve fagoforun (izolasyon membranı) uzaması ile meydana gelmektedir. İzolasyon membranının kökeni tam olarak bilinmesede, endoplazmik retikulum, mitokondri dış membranı ya da plazma membranından kaynaklandığı düşünülmektedir. TOR (target of rapamisin), ilk kez mayada belirlenen ve mantara karşı kullanılmak üzere geliştirilen rapamisin isimli ilacın hedefi olarak tespit edilen bir proteindir. Hücrede protein sentezini ve hücrenin büyümesini kontrol etmektedir. TOR normal besin koşulları altında hücrede aktif olup *Atg 13*' fosforiller. Böylece *Atg13-Atg1-ATg17* kompleksinin bozulmasına, *Atg 1* kinaz aktivitesinin engellenmesine ve otofajinin baskılanmasına neden olur. Besin açlığının olması durumunda ise TOR engellenir ve *Atg 13*'n fosforillenmesi gerçekleşmez. Böylece *Ulk1/Atg1-Atg13* protein kinaz kompleksi ile otofagozom şekillenmesi başlar. Otofagozomun ekirdeklenmesinde *Beclin-1 /Atg6-PIK3C3 / Vps34-Atg14L* kompleksleri yer almaktadır. Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)'in görevi bağlayıcı proteinler ile otofajik keseciğin oluşumunu başlatmaktır. Otofagozomun uzamasında ve tamamlanmasında ise iki ubikuitin

benzeri konjugasyon sistemi (Atg5-Atg12-Atg16L1 ve Atg8-PE) görev almaktadır. Atg12-Atg5-Atg16L1 kompleksi, izolasyon membranının (fagofor) dış yüzeyine bağlanır ve otofagozom oluşumu gerçekleştikten sonra bu kompleks vezikülden ayrılır. Atg8-PE konjugasyon sistemi ise Atg8'in (memelideki karşılığı LC3) bir yağ molekülü olan fosfatidiletanolamine (PE) kovalent bağlanması ile gerçekleşir. Bu bağlanma sonrası yağ molekülleri otofajik zarlara taşınır ve zarın uzaması sağlanır. Atg8-PE, fagoforun hem dış hem de iç zarında yerleşim göstermekte olup; olgun otofagozomda kalan tek Atg proteindir. Bundan dolayı, otofajiyi belirlemede otofagozom belirteci olarak Atg8-PE kullanılmaktadır. Bir diğer otofaji belirteci ise otolizozomlardır. Otolizozomlar, otofagozomların lizozom ile birleşmesinden meydana gelmektedirler. Otofagozom içerisinde yer alan işlevini kaybetmiş proteinler, hasarlı organeller ve istilacı mikroorganizmalar lizozom ile birleşme sonrasında lizozomal asit hidrolaz enzimleri tarafından yıkımı gerçekleşmektedir (Şekil 1.3) (Maiuri et al., 2007; Arslan ve ark., 2011; Gözüaçık, 2011; Tian and Li, 2015; Sahin ve Yıldız, 2017).



Şekil 1.3 Otofagozom ve otolizozomun şekillenmesi (Karadağ, 2016).

Son yıllarda hücre ölümü mekanizmaları ile ilgili omurgalı ve omurgasız hayvanlar üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalardan en çok göze çarpan konular ise otofaji ve apoptoz mekanizmalarıdır. Bu iki mekanizma arasındaki moleküler düzenlenmenin nasıl olduğu, birbirlerini nasıl etkiledikleri ve hücrede ne gibi değişikliklere yol açtığı araştırılmaktadır.

Apoptoz ve otofaji arasındaki ilişki çok kompleksdir. Belirli koşullar altında otofajinin apoptoza paralel olarak hücre ölümüne neden olabileceği gibi apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabileceği belirtilmiştir.

Drosophila'da metamorfoz sırasında tükürük bezinin dejenerasyonunda kaspazların, otofajik hücre ölümüne de katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Yeniden şekillenen yağ dokusunda ise otofaji ile apoptoz arasında bir denge vardır. Otofajinin engellenmesi kaspaz aktivitesine, apoptozun engellenmesi ise otofajik hücre ölümüne neden olmaktadır (Arslan ve ark., 2011; Tian and Li, 2015).

Bugüne kadar otofaji ve apoptoz arasındaki bağlantıda yer alabileceği düşünülen pek çok protein gösterilse de mekanizma tam olarak açık değildir. Bunun yanı sıra yapılan çalışmaların pek çoğu kanser hücrelerinde ya da toksikoloji çalışmaları sürecinde gerçekleştirilmiştir. Bu da fizyolojik olarak meydana gelen apoptoz-otofaji ilişkisine ait bilinenlerin çok daha sınırlı olmasına neden olmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda otofaji regülatörlerinin apoptozu kontrol edebileceği, intrinsik ve ekstrinsik yollarında rol alan düzenleyicilerin ise otofajiyi kontrol edebileceği belirtilmiştir. Apoptozun düzenlenmesinde görev alan Bcl2 gen ailesi, mitokondride bulunduğu zaman proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bax ve Bak proteinlerinin aktivasyonunu engelleyerek apoptozu inhibe etmektedir. Bax ve Bak'ın engellenmesi ile mitokondriyal porların açılması ve böylece sitokrom c'nin sitozole salınıp kaspaz aktivasyonunun başlaması önlenmektedir. Endoplazmik retikulumda bulunan Bcl2 ise otofajiyi kontrol etmekte olup otofajide görev alan beclin 1 (Atg 6) ile etkileşime girerek otofajinin engellenmesine neden olmaktadır. Bunun yanında Bcl2 ER'dan kalsiyumun salınmasını engelleyerek CAMKK- β , AMPK sinyal yolunun aktivasyonunda engellemektedir. CAMKK- β , AMPK sinyal yolu engellenmediği zaman, mTOR'u (memelide bulunan rapamisin hedefi) baskılayarak otofajinin aktif olmasını sağlar. Düzenlemede rol alan bir diğer gen ise Atg 5 (otofaji regülatörü)'dir. Atg 5, FADD adaptör proteini ile etkileşime girerek kaspaz aktivasyonuna neden olmaktadır. Bunun yanında, Atg 5'in calpain enzimi tarafından kesilmesi sonucu kesilmiş Atg 5'in mitokondriye geçmesine ve burada porların açılmasına neden olduğu; bunun sonucunda sitokrom c' nin sitozole geçerek kaspaz aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Thorburn, 2008).

1.5 Otofaji İnhibitörü

Son yıllarda otofaji ve apoptoz hücre ölümleri ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar özellikle kanser ve nörodejenaratif hastalıklar gibi

hastalıkların yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açılarından önem kazanmaktadır. Bundan dolayı otofaji ve apoptoz mekanizmasının nasıl düzenlendiği, iki mekanizma arasında ne gibi bağlantının olduğu, sinyal yolları arasındaki bağlantılar, otofajinin engellendiği durumlarda hücrelerde ne gibi farklılıkların meydana geldiği gibi soruların cevaplanması oldukça önemlidir.

Otofaji inhibitörleri, hücre ölümü bağlantılı çalışmalarda ve kanser tedavisi araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Hücrede meydana gelen ölümün otofajiye bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermek için kaspaz aktivasyonu yokluğunda, otofaji inhibitörleri kullanılarak otofaji engellenir. Böylece otofagozom ve otolizozom birikimiyle ilerleyen hücre ölümünün, otofajinin engellenmesi ile yavaşlaması ya da durması “otofajik hücre ölümü”nün en önemli kanıtıdır (Gözüaçık, 2011). Bunun yanında kanser tedavisi çalışmalarında otofajinin rolünün belirlenmesinde ve kanser ile ilişkisinin anlaşılmasında da otofaji inhibitörleri tercih edilmektedir. Otofajinin tümör üzerindeki rolü, hücrenin uyarısına, tipine ve çevresel şartlarına göre belirlenmektedir. Otofajinin kanser üzerinde olumlu ve olumsuz etkileri vardır. Bundan dolayı kanser ile otofaji arasındaki ilişki günümüzde halen anlaşılammıştır (Şencan, 2015). Otofaji inhibitörleri ile otofajinin baskılanması, otofajinin kanser hücrelerinde meydana gelen tümör üzerinde fonksiyonel önemini göstermekte ve kanser tedavisi için yeni bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

Son zamanlarda çalışmalarda kullanılan otofaji inhibitörleri, otofajiyi erken safhada inhibe edenler ve otofajiyi geç safhada inhibe edenler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Otofajiyi erken safhada inhibe etmek için kullanılan bileşenler, 3-Metiladenin (3-MA), wortmannin ve LY294002, fosfotidilinositol 3-kinazları (PI3) inhibe ederek etkili olmaktadır. Otofajiyi geç safhada inhibe etmek için kullanılan bileşenler ise, klorokuin (lizozomotropik ajan), bafilomisin A1 (V-ATPaz inhibitörü) ve pepstatin A (lizozomal proteaz inhibitörü)’dir. Otofagozomların lizozomal enzimler tarafından parçalanmasını engelleyerek hücreler için toksik olabilen anormal otofagozomların birikmesine neden olmaktadırlar. Klorokuin, hücrede bulunan lizozomların asidik pH'ını nötralize eden lizozomotropik bir ajandır. Bu ajan otofagozom ile lizozomların birleşmesini

ve otofajik proteinlerin parçalanmasını engelleyerek hücrede otofagozomların birikmesine yol açmaktadır (Donohue et al., 2011).

Fan et al., (2006) yaptıkları çalışmada, çeşitli konsantrasyonlarda ve zamanlarda uyguladıkları klorokuinin, A549 akciğer kanser hücreleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Düşük konsantrasyonda (0.25- 32 μ M) uygulanan klorokuinin, A549 hücrelerinde büyümeyi engellediği aynı zamanda, asidik kısımların (VAC) hacminde artışa neden olduğu, yüksek konsantrasyonda (64–128 μ M) 24 saat boyunca A549 hücrelerine uygulanan klorokuinin ise apoptozu uyardığı, morfolojik değişikliklere ve nükleer parçalanmaya neden olduğu, ayrıca lizozomal vakuollerin arttığı belirtilmiştir. Ek olarak A549 hücrelerinin 32-64 μ M klorokuin ile 72 saat ya da 128 μ M klorokuin ile 48 saat muamele edilmesi, hücrelerde nekroza neden olmuştur (Fan et al., 2006).

Zheng et al., (2009) gerçekleştirdikleri çalışmada, fare kolon kanser hücresi CT26'ya uygulanan klorokuinin, uygulanma dozuna ve zamanına bağlı olarak hücre çoğalmasını engellediği ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Zheng et al., 2009).

Romanelli et al., (2016) yaptıkları çalışmada, *Bombyx mori* larvalarına klorokuin uygulaması gerçekleştirmişlerdir. Klorokuin uygulaması sonrası, orta bağırsak hücrelerinde lizozom ve otofagozomların biriktiği gözlemlenmiştir. Bunun yanında klorokuin uygulanmış larvanın yeni oluşan pupal epitelinin morfolojisinde değişiklik meydana gelmezken, larval epitelinin düzenlenmesinin tamamen farklı olduğunu belirtmişlerdir (Romanelli et al., 2016).

Bu çalışmada amacımız, ipek böceğinin posterior ipek bezinde, larval-pupal metamorfoz sırasında meydana gelen dejenerasyonda otofajinin rolünün belirlenmesi ve otofaji inhibisyonu ile apoptotik sürece olabilecek olası etkilerinin gözlenmesidir. Bundan dolayı, 5. larval evrenin farklı günlerinde ve farklı dozlarda enjeksiyon yoluyla klorokuin uygulanmış, uygulama sonrasında otofajik aktivitede meydana gelen değişimler hem morfolojik olarak hem de asit fosfataz enzim aktivitesi ölçümleri ile belirlenmiştir. Kontrol grubu ile uygulama gruplarından elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Deney Hayvanlarının Yetiştirilmesi

Yapılan çalışmada deney hayvanı olarak ipek böceği *Bombyx mori* kullanılmıştır.

İpek böceği kültür laboratuvarının şartları, laboratuvar sıcaklığı 25 ± 1 °C ve nem %70-85 oranında olacak şekilde ayarlanmıştır. Bursa Kozabirlik'ten elde edilen Japon × Çin polihibridi beyaz monovoltin ırk *Bombyx mori* yumurtaları,, 8-10 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Yumurtadan çıkan larvalar sabah, öğle ve akşam, günde 3 kere aynı saatlerde olmak üzere taze dut yapraklarıyla beslenmiştir. 5. larval evreye geçen ipek böceklerinden 7. günden itibaren başlanıp pupaya geçişten bir gün sonrasına kadar posterior ipek bezi dokuları elde edilmiştir. Böcekler kontrol grubu, 1 mg uygulama grubu ve 3 mg uygulama grubu olmak üzere üç gruba ayrılmıştır.

2.2 Deneyde Kullanılan Otofaji İnhibitörü

Yapılan deneyde otofaji inhibitörü olarak klorokuin (sigma, C6628) kullanılmıştır.

❖ Kimyasal özellikleri

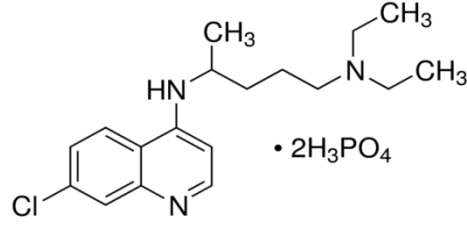
Sinonimi: N^4 -(7-Chloro-4-quinolinyl)- N^1,N^1 -dimethyl-1,4-pentanediamine diphosphate salt, N4-(7-chloroquinolin-4-yl)-N1,N1-diethylpentane-1,4-diamine diphosphate

Formülü: $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$

Moleküler ağırlığı: 515.86 g/mol

Çözünürlüğü: Su içerisinde 50 mg/ml

Yapısı:



❖ Klorokuin reaktifinin hazırlanması

1 mg uygulama grubu için

1 gr klorokuin otoklavlanmış 10 ml ultrapür su içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon +4 C°de saklanmıştır. Klorokuin uygulaması 5. instarın 7. gününün 2. yarısı ile 5. instarın 8. gününün 2. yarısında yapılmıştır.

3 mg uygulama grubu için

3 gr klorokuin otoklavlanmış 10 ml ultrapür su içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon +4 C°de saklanmıştır. Klorokuin uygulaması 5. instarın 7. gününün 2. yarısı ile 5. instarın 8. gününün 2. yarısında yapılmıştır.

- Kontrol grubu için herhangi bir reaktif uygulanmamıştır.

2.3 Posterior İpek Bezinin Elde Edilmesi

Kontrol ve uygulama gruplarında 5. larval evrenin 7. gününden itibaren aynı saatlerde disseksiyon yapılmış ve posterior ipek bezleri elde edilmiştir. Elde edilen ipek bezleri LPS (lepidopter fosfat tuzu) çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkanan dokuların bir kısmı biyokimyasal analizler için ayrılıp -80 C°de, kalan kısmı ise histolojik analizler için Bouin ile fikse edilip %70 alkolde saklanmıştır.

LPS (*Lepidopteran phosphate saline*) çözeltisinin hazırlanışı

NaCl	5,20 gr
KCl	0,16 gr
CaCl ₂	0,24 gr
NaHCO ₃	0,16 gr

- LPS için hassas terazide tartılan kimyasalların üzeri 500 ml saf su ile tamamlanmış, pH 6,5'e ayarlanmıştır.

2.4 Histolojik Analizler

Bouin çözeltilisinin hazırlanışı

Satüre aqueous pikrik asit	75 ml
%40'lık formaldehit	25 ml
Asetik asit	5 ml

Parafine Gömme

Fiksatiften kurtarma	%70 alkol	
Dehidrasyon	%80 alkol	2x10 dk
	%96 alkol	2x10 dk
	%100 alkol	2x10 dk
Şeffaflaştırma	%100 alkol-ksilol (1:1)	15 dk
	Ksilol	2x5 dk
Parafinizasyon	Ksilol-parafin (1:1)	30 dk
	Parafin I	1 saat
	Parafin II	1 saat

Bloklama

Kesit Alma

Parafin bloklarda gömülü olan dokulardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır.

Boyama İşlemi

Deparafinizasyon	Ksilol	2x15 dk
Hidratasyon	%100 alkol	2x10 dk

	%96 alkol	2x10 dk
	%80 alkol	2x10 dk
	%70 alkol	2x10 dk
Boyama1	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
	Saf su	1 dk
Boyama2	Eozin	1,5 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
	Saf su	1 dk
Dehidratasyon	%70 alkol	2x5 dk
	%80 alkol	2x5 dk
	%96 alkol	2x5 dk
	%100 alkol	2x5 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol	2x10 dk
Kapama	Entallen	

Boyama işlemi uygulanan dokuların histolojik analizi ve fotoğraflarının çekimi, Zeis Axioscope marka ışık mikroskobu altında gerçekleştirilmiştir.

Gill's hematoksilen ve Eozin'nin hazırlanması

Gill's hematoksilen

Hematoksilen	6 gr
Alüminyum sülfat	80 gr
Glaciol asetik asit	20 ml
Sodyum iodat	0,6 gr
Etilen glikol	250 ml

Distile su 750 ml

- Hazırlanan boyanın olgunlaşması için karanlık ortamda 2 hafta kadar inkübasyona bırakılır.

Eozin

Eozin 1 gr

%70 alkol 100 ml

Glasial asetik asit 5 ml

2.5 Biyokimyasal Analizler

2.5.1 Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Total protein miktarının belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Standart olarak 2 mg/ml stok sığır albümininden (BSA, Pierce) 30 µl'de 20 µg, 15 µg, 10 µg, 5 µg ve 0 µg protein olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. 30 µl örneklerin ve standartların her birine 900 µl Bradford reaktifi (Sigma) eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra birbirlerine iyice karışması için vortekslenen örnekler polistren küvetlere yerleştirilmiştir. Örnekler ve standartlar 595 nm'de Agilent Technology Carry 60 UV-Vis marka spektrofotometrede okutulmuş ve standart grafikleri çizilip, örneklerin her birinin total protein miktarları hesaplanmıştır.

Bradford reaktifi

Comassie brilliant blue G250 0,1 gr 50 ml'lik %95 etanol içerisinde çözdürülmüştür. Üzerine 100 ml'lik %85 fosforik asit eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Üzeri ultrapür su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Filtre kağıdı ile süzöldükten sonra koyu bir şişe içerisinde +4 C'de saklanmıştır.

2.5.2 Asit Fosfataz Enzim Analizi

İpek bezi dokularında ki asit fosfataz enzim aktivitesini belirlemek için Bergmeyer (1974) yöntemi kullanılmıştır. Asit fosfataz enzim analizi için -80 C°de saklanan dokular çıkarılarak 37 C°de çözdürülmüştür. Çözünen dokular hassas terazide tartılarak 1,5 ml'lik endoporfllara konulmuştur. Üzerlerine 1000 µl,

%0,9'luk NaCl çözeltisi eklenerek oda ısısında homojenize edilmiştir. Homojenize edilen dokular 8000 G'de 15 dk +4 C'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen homojenatta asit fosfataz analizi 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Asit fosfataz aktivitesini belirlemek için, 100µl sitrat tamponu, 100µl p-nitrofenil fosfat çözeltisi ve 200 µl homojenat karıştırılarak 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra bu reaksiyon 1 ml, 0,1 N NaOH eklenmesiyle durdurulmuştur.

Standartları belirlemek için, 0,00139 gr p-nitrofenol 10 ml sitrat tamponunda çözdürülmüştür. Her defasında hazırlanan bu çözeltiden aşağıda belirtilen miktarlarda standartlar hazırlanmış, üzerleri NaOH ile 1,4 ml'ye tamamlanmıştır.

Kör sitrat tamponu olacak şekilde hazırlanmıştır.

10 µl çekilir;	10 nmol	10 µl + 1390 µl NaOH
20 µl çekilir;	20 nmol	20 µl + 1380 µl NaOH
40 µl çekilir;	40 nmol	40 µl + 1360 µl NaOH
60 µl çekilir;	60 nmol	60 µl + 1340 µl NaOH
80 µl çekilir;	80 nmol	80 µl + 1320 µl NaOH
100 µl çekilir;	100 nmol	100 µl + 1300 µl NaOH
120 µl çekilir;	120 nmol	120 µl + 1280 µl NaOH

Hazırlanan standartlar ve örnekler polistren küvetlerde Agilent Technology Cary 60 UV Vis spektrofotometre cihazı ile 410 nm dalga boyunda okutulmuştur. Elde edilen veriler ile standart grafiği çizilmiştir ve her bir örnek için asit fosfataz miktarları ölçülmüştür. 1 gr dokudaki asit fosfataz miktarı unit cinsinden belirlenmiş ve daha sonra 1 mg proteinde bulunan enzim miktarı hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi unit/mg protein cinsinden belirlenmiştir.

Sitrat tamponu: 90mM, pH: 4,8

Sitrik asit: 0,789 gr

Sodyum nitrat: 1,540 gr

Ultrapür su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

0,1 N NaOH çözeltisi

NaOH 4gr

Saf su 1 lt

p-nitrofenil fosfat solusyonu

p-nitrofenol fosfat 0,0027 gr

Sitrat tamponu 20 ml

2.6 İstatistik

Çalışmada yapılan istatistik analiz için PASW Statistics 18 programı kullanılmıştır. Çalışmadaki örneklem sayısı 50' den az olduğu için Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Shapiro-Wilk testinin "Sig." değerleri 0.05' den yüksek olması ile bütün gruplar için elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olduğu bulunmuştur. Uygulama grupları ile kontrol grupları birbirinden bağımsız olduğu için 'Bağımsız T Testi' tercih edilmiş ve gruplar arasındaki anlamlılık düzeyleri incelenmiştir. Bağımsız T Testi tablosunun Sig. (Anlamlılık) sütunundaki değer 0,05'den küçük olduğu için, uygulama grubu ile kontrol grubunun arasındaki ilişkinin $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiş ve grafikte sütunların üzerinde yıldız (★) işareti ile belirtilmiştir (Eymen, U. E., 2007).

3. BULGULAR

Çalışmamız bir kontrol ve iki uygulama grubu olmak üzere 3 grup ipek böceği üzerinde gerçekleştirilmiştir. İpek böceklerinin 5. instarın 7. gününde beslenmeyi kesmesi ve bağırsak içeriklerini boşaltması ile birlikte 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulamaları yapılmaya başlanmıştır.

Kontrol grubundaki ipek böcekleri 5. larval dönemi 10 günde tamamlamış ve 11. günde pupalaşmışlardır. Çalışmamızda pupalaştıkları gün, pupanın sıfırıncı saati P0, pupanın yirmi dördüncü saati ise P24 olarak belirlenmiştir.

Uygulama yapılan böceklerde ise, bağırsak içeriğinin boşaltılması olayı gerçekleştikten sonra koza örme davranışını tamamladıkları, fakat larval-pupal deri değişimini gerçekleştiremedikleri tespit edilmiştir. Araştırmamızda bu gruptaki hayvanların gelişim safhaları belirlenirken, pupalaşma gerçekleşmediği ve larval safha uzadığı için gelişim günleri, L11; larvanın 11. günü, L12; larvanın 12. günü olarak belirtilmiştir. 12. günden sonra ise uygulama yapılan böcekler ölmüştür.

3.1 Histolojik Bulgular

Kontrol ve uygulama grubundaki ipek böceklerinden elde edilen posterior ipek bezi kesitleri, hematoksilin-eozin boyası ile boyanmış, larval-pupal deri değişimi sırasında dokuda meydana gelen morfolojik değişimler ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

5. instarın 7. gününde böceklerin beslenmeyi sonlandırması ile gerçekleşen klorokuin uygulamaları sonrasında, posterior ipek bezlerinin genel görünümü şekil 3.1'de; ayrıntılı görünümü ise şekil 3.2'de yer almaktadır. 5. instar 8. gün kontrol grubuna baktığımızda bezin genel yapısı sağlıklı görünümündedir. Lümeni çevreleyen tek sıralı salgı epiteli ayırt edilmektedir (Şekil 3.1.a). Klorokuin uygulaması yapılan grupları incelediğimizde, uygulama gruplarında da kontrol grubunda olduğu gibi bezin genel yapısında bu günde bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 3.1.b,c). 9. günde kontrol grubunda, salgı epiteli hücrelerinin nukleuslarının nispeten koyu boyanması apoptozise spesifik nuklear yoğunlaşmanın meydana gelmeye başladığına işaret etmektedir (Şekil 3.1.d).

Uygulama gruplarında da benzer nuklear yoğunlaşmanın meydana geldiği görülmektedir (Şekil 3.1.e,f). Kontrol grubunda, 10. gününde larval-pupal deri değişimi gerçekleşmektedir. Bu günde bez yapısı küçülmeye başlamakta ve bununla birlikte ipek bezi hücrelerinin membran yapılarında değişimler meydana gelmektedir. Meydana gelen değişimlerden kaynaklı olarak tunica propriadaki invajinasyonlar artmaktadır. Nuklear yoğunlaşma oldukça ilerlemiştir. Hücre sınırları ayırt edilememektedir. Hücreler içerisinde çok sayıda vakuol yapısı dikkat çekmektedir (Şekil 3.1.g). Uygulama gruplarında ise kontrol grubunda meydana gelen değişimler gerçekleşmediği görülmektedir. İpek bezini dıştan çevreleyen tunika propria önceki günlerde olduğu gibi düzenli görünmektedir. Aynı şekilde bezin hacminde küçülme de tespit edilmemiştir (Şekil 3.1.h,i). Kontrol grubunda, larval-pupal deri değişimi gerçekleştikten hemen sonra pupanın sıfırıncı saatinde (P0) morfolojik değişimler daha da belirginleşmiş, bezdeki küçülme ilerlemiştir. Bez hücrelerinde yapısal bozulma artmıştır (Şekil 3.1.j). Klorokuin uygulanan gruplarda bezin hacminin küçülmeye başladığı ve özellikle 3 mg uygulanan grupta bezin çevresinin düzensizleştiği belirlenmiştir (Şekil 3.1.k,l). Kontrol grubunda pupanın yirmidördüncü saatine (P24) baktığımızda, bezin tamamen dejenere olduğu ve hücre artıklarını içeren bir kitle şeklinde kaldığı görülmektedir (Şekil 3.1.m). Klorokuin uygulama gruplarında ise kontrol grubunun aksine bez yapısı hala ayırt edilmektedir (Şekil 3.1.n,o). 1 mg uygulama grubunda hücresel yapıdaki dejenerasyon ve tunica proprianın düzensizleşerek bezden ayrılmaya başlaması dikkat çekmektedir (Şekil 3.1.n). 3 mg uygulama grubunda ise bezin dejenerasyonuna ilişkin morfolojik bulgular çok daha azdır. Bezin çevresi kısmen düzensizleşmiş; nukleer yoğunlaşma ilerlememiştir. 1 mg uygulama grubuna göre bozulmadan kalan bir bez yapısı görülmektedir (Şekil 3.1.o).

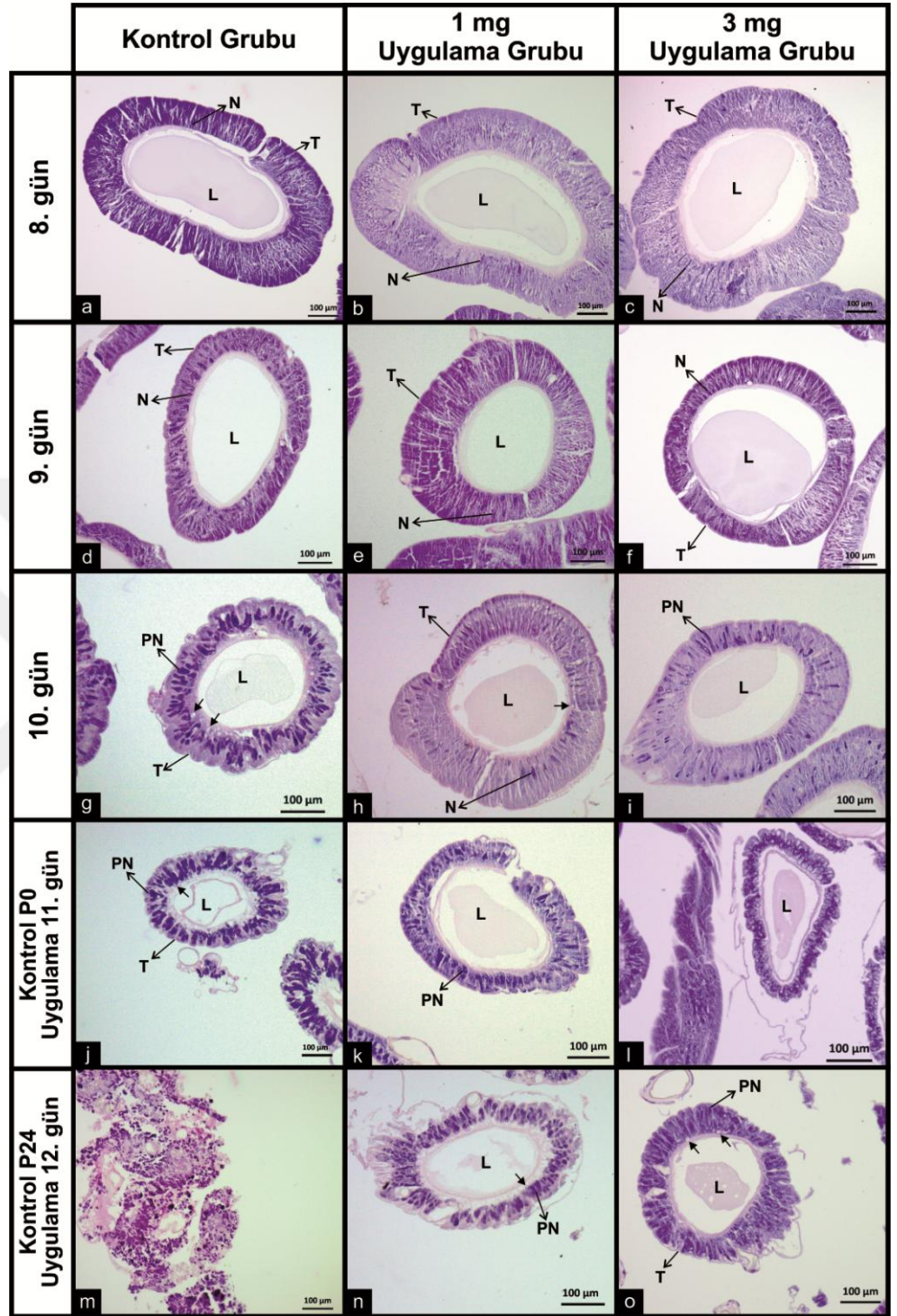
5. instarın 7. gününde yapılan klorokuin uygulaması sonrası bezlerin morfolojilerinin ayrıntılı incelemeleri de gerçekleştirilmiştir. 8. günde hem kontrol hem de uygulama gruplarında, hücreler arası sınırları belirgin olmayan, sağlıklı bez epiteli görülmektedir. Epitel hücreler arasında sıkı bağlantılardan dolayı hücreler arası sınırlar ayırt edilememektedir (Şekil 3.2.a,b,c). 9. günde nuklear yoğunlaşmanın başlamasından dolayı dallanmış nukleusa ait kesitler oldukça iyi ayırt edilmektedir (Şekil 3.2.d). Kontrol grubuna benzer şekilde, uygulama

gruplarının salgı epiteli hücrelerinde de benzer nuklear yoğunlaşma görülmektedir (Şekil 3.2.e,f).

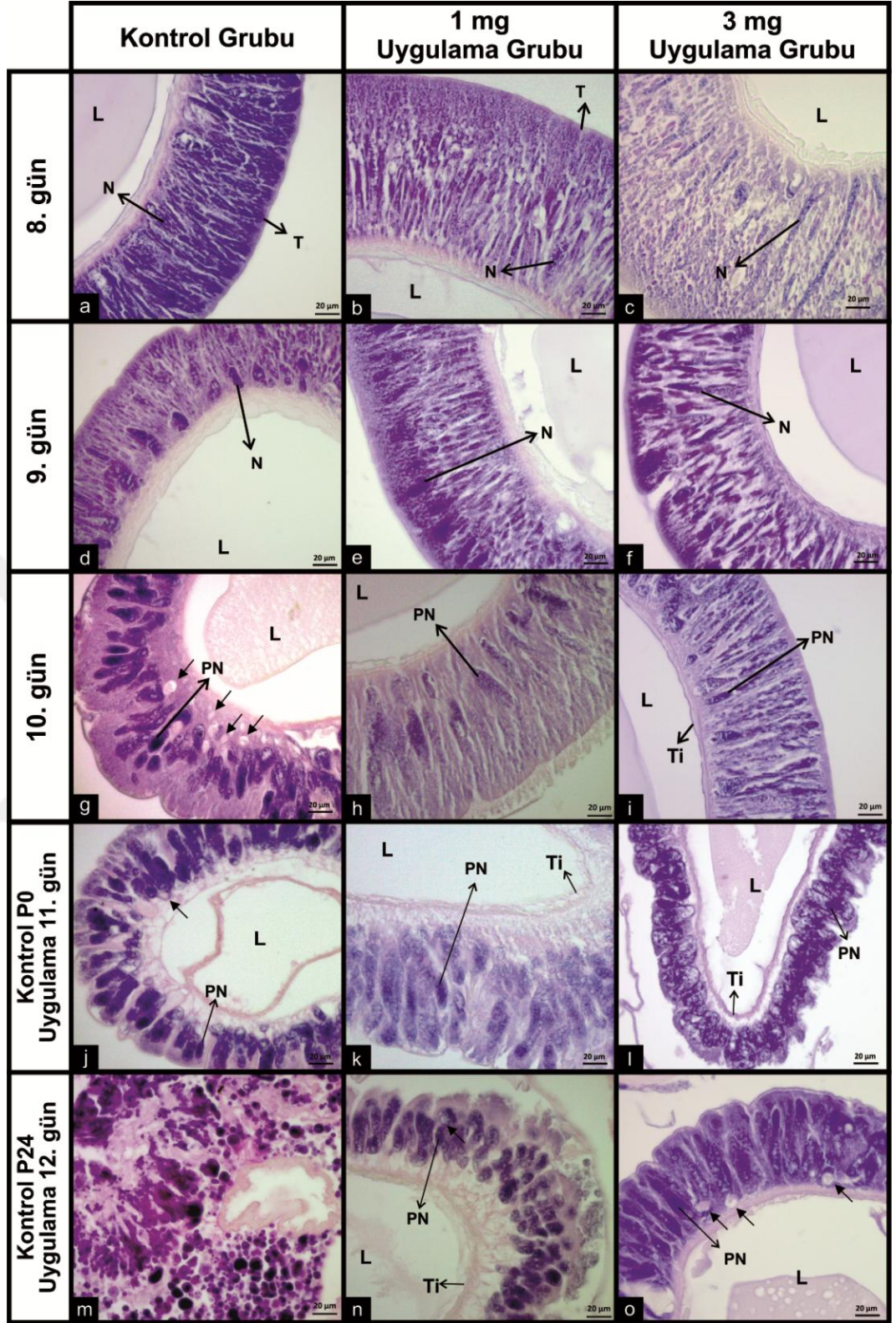
5. larval evrenin 10. gününde, kontrol grubunda nukleusların piknotik bir görünüm aldığı, sitoplazmanın iyice yoğunlaştığı ve sitoplazma içerisinde vakuol birikiminin meydana geldiği görülmektedir. Bezin dış yüzeyi tunica proprianın invajinasyonu nedeniyle düzensizleşmiştir (Şekil 3.2.g). Uygulama gruplarına baktığımızda, tunica proprianın düzenli yapısını koruduğu ve bezin yapısında herhangi bir küçülmenin meydana gelmediği görülmektedir. Ayrıca sitoplazmik ve nuklear yoğunlaşma kontrol grubuna kıyasla oldukça düşük düzeydedir (Şekil 3.2. h, i).

Kontrol grubunda, larval pupal deri değişimin hemen sonrasında, pupanın 0. saatinde posterior ipek bezlerinin salgı epitelinde dejeneratif değişikliklerin daha da arttığı belirlenmiştir. Sitoplazmik vakuol yapılarının genişlediği, hücrelerin hacimlerinin azaldığı görülmektedir. Hücrelerin dallanmış morfolojideki nuklear yapılarına ait kesitler, kromatin materyalinin yoğunlaşması nedeniyle oldukça belirgindir. Tunica intima, hücrelerin apikal yüzeyinden ayrılmıştır (Şekil 3.2.j). 1 mg ve 3 mg uygulama gruplarına detaylı baktığımızda, her iki grupta da bir önceki güne kıyasla posterior ipek bezlerindeki dejenerasyonun ilerlediği görülmektedir. Nukleus yapıları yoğun boyanan kromatin içeriği ile oldukça belirgindir (Şekil 3.2.k,l).

Pupal evrenin 24. saatinde kontrol grubunda, posterior ipek bezinin tamamen dejenerasyonu sonrasında hücresel içeriğin dağılmış olduğu; eozinofilik vakuoler yapıların yoğunlaştığı ve bu vakuoler yapıların bir kısmında nukleus parçalarının bulunduğu görülmektedir (Şekil 3.2.m). 1 mg klorokuin uygulamalarında hücrelerin apikal ve bazal bölgelerinde vakuoler yapıların bulunduğu belirlendi. Hücrelere ait nukleuslar yoğun yapılarını muhafaza etmektedir. Tunika intima ise perifere itilmiş gibi görünmektedir (Şekil 3.2.n). 3 mg uygulama grubunda ise posterior ipek bezi yapısının büyük ölçüde korunduğu belirlenmiştir. Hücre sitoplazma ve nukleuslarının yoğun bir şekilde kaldığı görülmektedir. Özellikle hücrelerin apikal yüzeylerinde yer yer vakuolar yapılar dikkat çekmektedir (Şekil 3.2.o).



Şekil 3.1 İpek böceği *Bombyx mori*'de larval-pupal metamorfoz sırasında, 5. instar kontrol grubu, 7. gün 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulamaları sonrasında posterior ipek bezinde meydana gelen morfolojik değişimlerin genel görüntüsü. Lümen (L), nukleus (N), piknotik nukleus (PN), tunica propria (T), ok işaretleri otofajik vakuolleri ifade etmektedir.

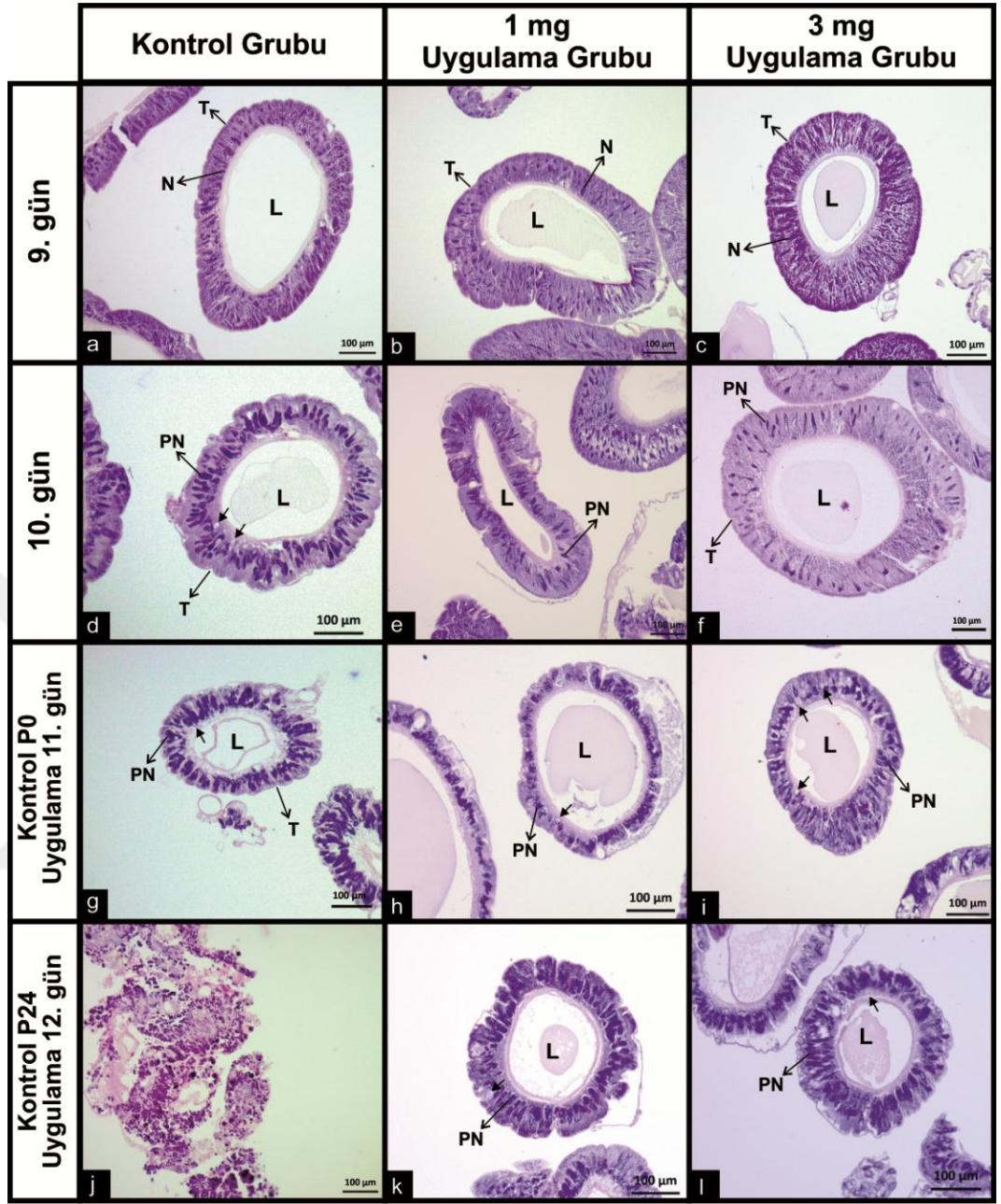


Şekil 3.2 İpek böceği *Bombyx mori*'de larval-pupal metamorfoz sırasında, 5. instar kontrol grubu, 7. gün 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulamaları sonrasında posterior ipek bezinde meydana gelen morfolojik değişimlerin ayrıntılı görüntüsü. Lümen (L), nukleus (N), piknotik nukleus (PN), tunica propria (T), tunica intima (Ti), ok işaretleri otofajik vakuollerini ifade etmektedir.

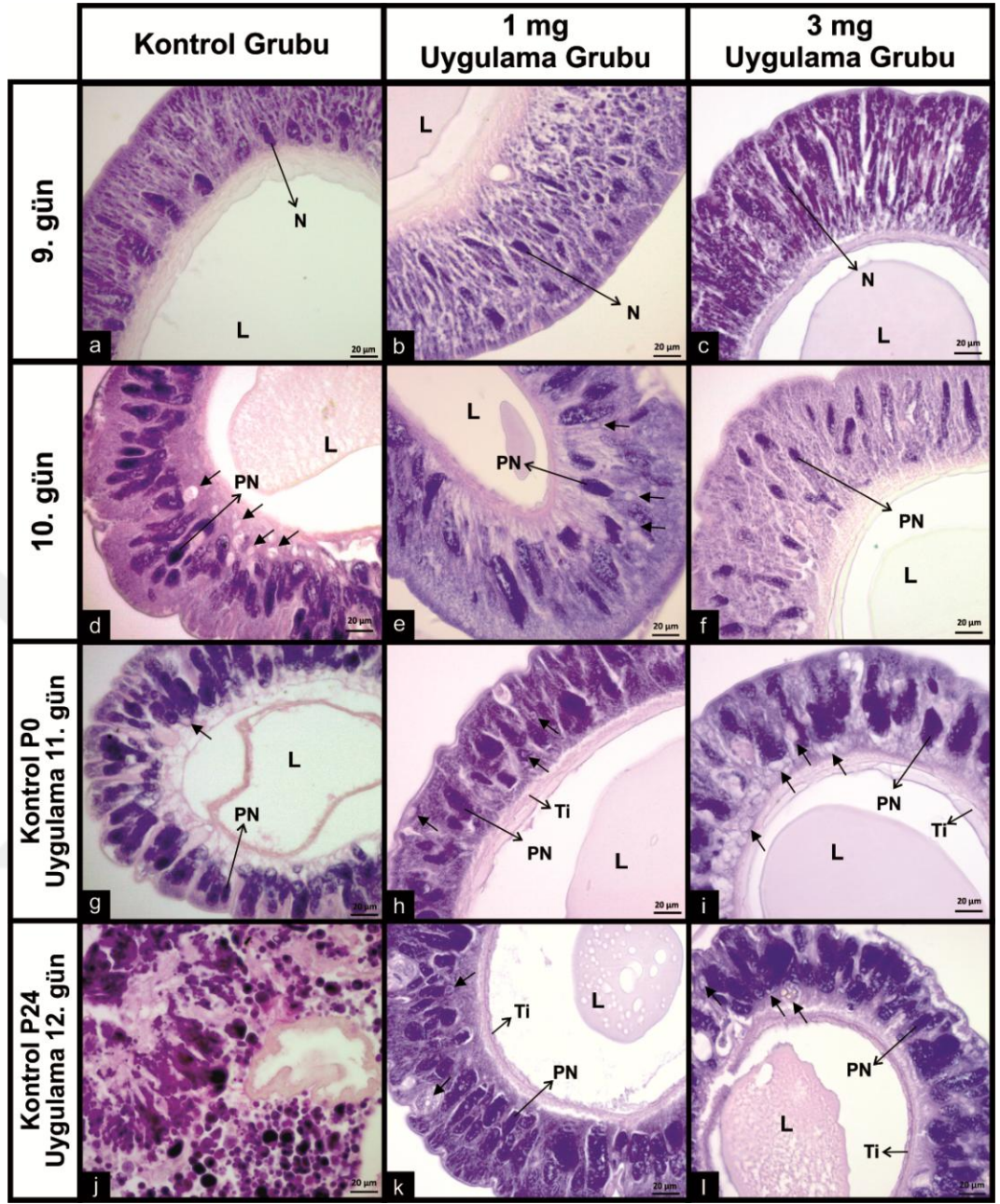
Şekil 3.3'de 5. instarın 8. gününde gerçekleşen klorokuin uygulamaları sonrasında, posterior ipek bezlerinin genel görünümüleri, şekil 3.4'de ise detaylı görünümüleri yer almaktadır. 9. gün kontrol grubundan elde edilen posterior ipek bezlerinin genel görünümüne baktığımızda, programlı hücre ölümüne ait belirtiler görülmeye başlanmıştır (Şekil 3.3.a). Hücre nukleuslarında yoğunlaşma gerçekleşmiş ve buna bağlı olarak nukleuslar koyu boyanmıştır. 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulanan gruptan elde edilen posterior ipek bezi kesitlerini incelediğimizde de, kontrol grubu ile arasında morfolojik bir farklılık belirlenmemiştir (Şekil 3.3.a,b,c). Son larval evrenin 10. gününde kontrol grubu hücrelerinde nuklear yoğunlaşmanın ilerlediği ve hücrelerin hacimlerinin azalması sonucu tunika proprianın düzensizleştiği gözlenmiştir (Şekil 3.3.d). 1 mg klorokuin uygulama grubunda elde edilen posterior ipek bezlerinin genel yapısı kontrol grubu ile benzerlik göstermekte (Şekil 3.3.e); ancak 3 mg uygulama grubunda nuklear yoğunlaşmanın fazla ilerlemediği ve bez hücrelerinin büyüklüklerinin önceki günle benzer olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.3.f). Kontrol grubunda pupanın sıfırıncı (P0) saatinde, bezin yapısı düzensizleşmiş, bez hücreleri oldukça küçülmüş ve dejeneratif değişimler oldukça ilerlemiştir (Şekil 3.3.g). 1 mg klorokuin uygulanan gruptaki hücrelerde oldukça küçülmüş ve dejenerasyon ilerlemiştir (Şekil 3.3.h). 3 mg uygulama grubunda ise nukleuslardaki yoğunlaşma ilerlemiştir (Şekil 3.3.i). Pupal evrenin 24. saatinde, kontrol grubunda posterior ipek bezi tamamen dejenere olmuştur (Şekil 3.3.j). Buna karşılık klorokuin uygulama gruplarında posterior ipek bezlerinin dejenerasyonu ilerlememiştir (Şekil 3.3.k,l).

Bu uygulama gruplarına ilişkin yapılan detaylı gözlemlerde, 5. larval evrenin 9. gününde, kontrol grubunda bez hücreleri sağlıklı görünmekle birlikte nukleuslarındaki yoğunlaşma dikkat çekicidir. Kalın bir kütikula intima tabakası hücrelerin apikalinde izlenmektedir (Şekil 3.4.a). Uygulama grupları da benzer morfolojiye sahiptir (Şekil 3.4.b,c). 5. larval evrenin 10. gününde kontrol grubu bez hücrelerinin özellikle apikal bölgesinde, çok sayıda vakuol dikkat çekmektedir. Bunun yanı sıra oldukça yoğunlaşmış nuklear yapı iyi ayırt edilmektedir (Şekil 3.4.d). Benzer vakuol yapıları 1 mg klorokuin uygulanan hücrelerin sitoplazmalarında da belirlenmiştir (Şekil 3.4.e); ancak 3 mg uygulama grubunda vakuol yapıları ayırt edilmemiştir (Şekil 3.4.f).

Pupal evrenin 0. saatinde kontrol grubu hücrelerinde vakuol yapıları genişlemiştir. Tunika intimanın hücrelerin apikalinden ayrılmış olduğu belirlenmiştir. Nükleuslar yoğun boyanma özellikleri ile hücre içerisinde oldukça belirgindir (Şekil 3.4.g). Uygulama gruplarının posterior ipek bezi epitelinde de vakuol yapıları belirlenmiş; özellikle 3 mg uygulama grubunda vakuol yapılarının hücrelerin periferinde biriktiği gözlenmiştir. Buna karşılık tunika intima hücrelerin apikalinde yer almaktadır (Şekil 3.4.h,i). Pupal safhanın yirmi dördüncü (P24) saatinde, kontrol grubunda bezin tamamen yıkımı sonrasında hücrelerden kalan artıklar vakuol benzeri; içeriğine bağlı olarak farklı boyanma özelliğine sahip yapılar şeklinde izlenmiştir (Şekil 3.3.j). Her iki uygulama grubunda ise bez yapısının parçalanmadığı, nükleusların ve sitoplazmalarının iyice yoğunlaştığı vakuollerin hala hücreler içerisinde bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.4.k,l).



Şekil 3.3 İpek böceği *Bombyx mori*'de larval-pupal metamorfoz sırasında, 5. instar kontrol grubu, 8. gün 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulamaları sonrasında posterior ipek bezinde meydana gelen morfolojik değişimlerin genel görüntüsü. Lümen (L), nukleus (N), piknotik nukleus (PN), tunica propria (T), ok işaretleri otofajik vakuolleri ifade etmektedir.



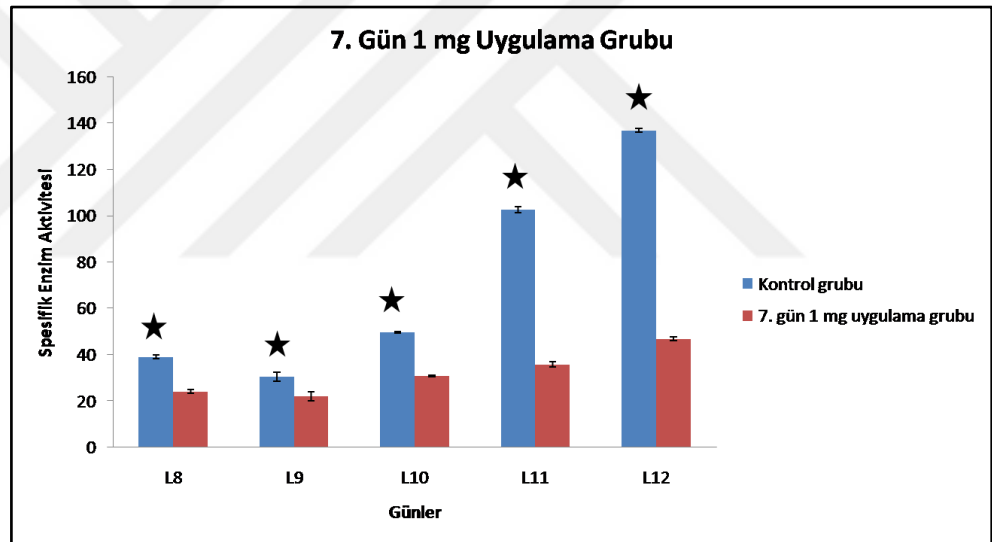
Şekil 3.4 İpek böceği *Bombyx mori*'de larval-pupal metamorfoz sırasında, 5. instar kontrol grubu, 8. gün 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulamaları sonrasında posterior ipek bezinde meydana gelen morfolojik değişimlerin ayrıntılı görüntüsü. Lümen (L), nukleus (N), piknotik nukleus (PN), tunica propria (T), tunica intima (Ti), ok işaretleri otofajik vakuelleri ifade etmektedir.

3.2 Asit Fosfataz Enzim Analizi Bulguları

Asit fosfataz enzimi, otofaji belirteci olarak kullanılan lizozomal bir enzimdir. Yapılan bu çalışmada, kontrol ve uygulama gruplarında bulunan enzim miktarları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

5. larval evrenin 7. ve 8. günlerinde kontrol gruplarında, asit fosfataz aktivitesinin prepupal dönem öncesi düşük olduğu, beslenmenin olmadığı pupal dönemde ise enzim aktivitesinin yüksek oranda arttığı görülmektedir (Şekil 3.5 ile Şekil 3.7).

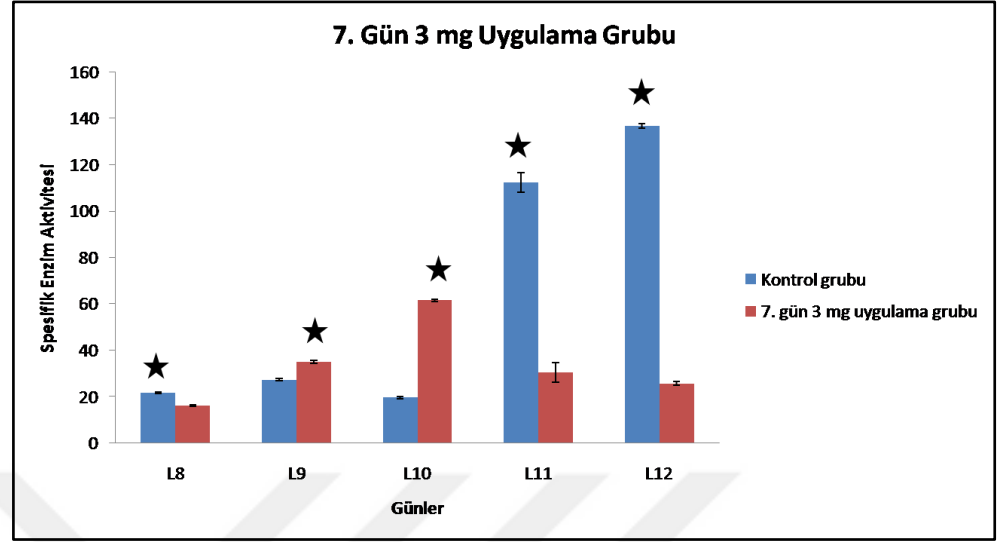
7. gün 1mg uygulama grubuna baktığımızda, çalışılan tüm günler boyunca uygulama grubunda belirlenen asit fosfataz enzim aktiviteleri kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 İpek böceği *Bombyx mori*, 5. instar 7. gün 1 mg klorokuin uygulaması sonrası enzim aktiviteleri. 5. İnstarın 8. günü - L8, 9. günü -L9, 10. günü - L10, 11. günü - L11 ve 12. günü - L12 olarak adlandırılmıştır. Barlar ortalama \pm standart hata'yı belirtmektedir. ★: İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin belirlendiği günlerdir.

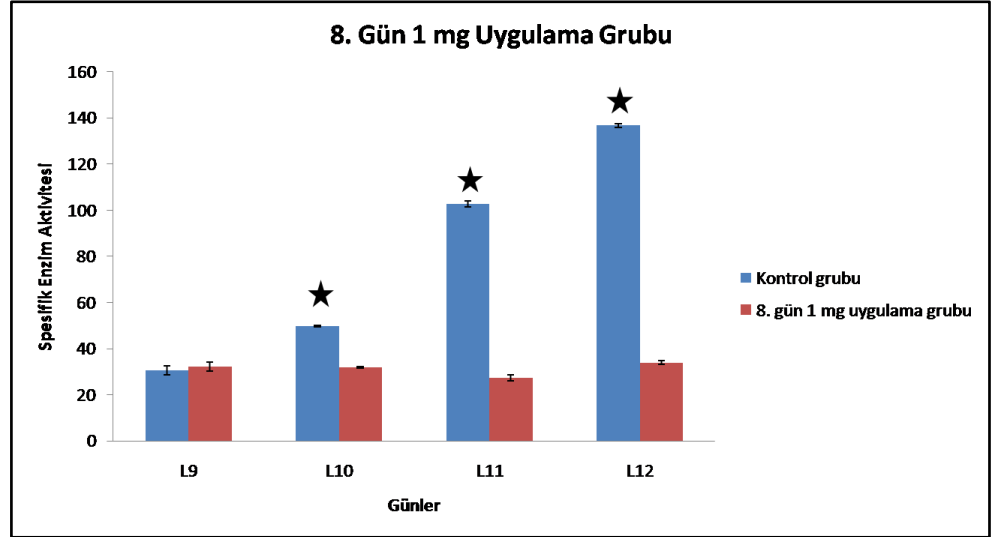
7. günde 3 mg uygulama grubunda, uygulama sonrası enzim aktivitesinde azalma olmasına rağmen 9. ve 10. günlerde enzim aktivitesi kontrol grubundan anlamlı ölçüde yüksektir ($p<0,05$). Bununla birlikte kontrol grubunda larval pupal deri değişiminden sonra asit fosfataz aktivitesi hızla artmış; uygulama grubunda ise asit fosfataz enzim aktiviteleri kontrol grubundan anlamlı ölçüde düşük

bulunmuş ve kontrol grubuna oranla yaklaşık 7 katlık bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.6).



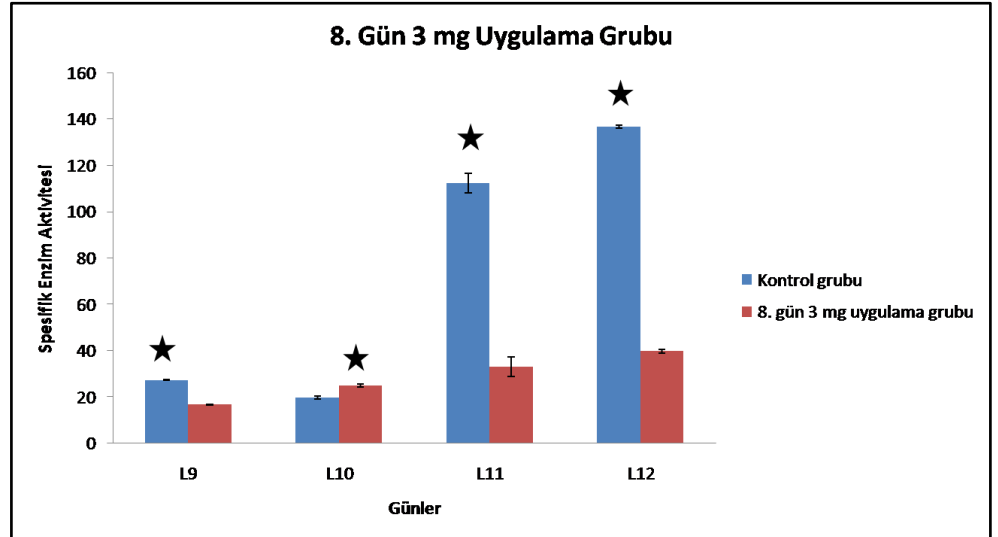
Şekil 3.6 İpek böceği *Bombyx mori*, 5. instar 7. gün 3 mg klorokuin uygulaması sonrası enzim aktiviteleri. Barlar ortalama \pm standart hata'yı belirtmektedir. ★: İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin belirlendiği günlerdir.

8. günde 1 mg uygulama grubunu incelediğimizde, 5. larval evrenin 9. gününde kontrol ve uygulama grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). Sonraki günlerde ise kontrol grubunda artan asit fosfataz aktivitelerine karşılık uygulama grubunda asit fosfataz aktiviteleri kontrol grubundan anlamlı derecede düşüktür ($p<0,05$) (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 İpek böceği *Bombyx mori*, 5. instar 8. gün 1 mg klorokuin uygulaması sonrası belirlenen enzim aktiviteleri. Barlar ortalama \pm standart hata'yı belirtmektedir. ★: İstatistiksel olarak anlamlı meydana gelen değişimlerin görüldüğü günlerdir.

8. günde 3 mg uygulamasında, asit fosfataz enzim aktivitesinin 9. günde kontrole oranla anlamlı bir şekilde azaldığı, 10. günde ise kontrole oranla anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Sonraki günlerde ise kontrol grubunda pupal evrede gerçekleşen enzim aktivitelerindeki artış uygulama grubunda gerçekleşmemiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 İpek böceği *Bombyx mori*, 5. instar 8. gün 3 mg klorokuin uygulaması sonrası enzim aktiviteleri. Barlar ortalama \pm standart hata'yı belirtmektedir. ★: İstatistiksel olarak anlamlı meydana gelen değişimlerin görüldüğü günlerdir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bombyx mori'de larval-pupal metamorfoz sırasında, orta bağırsak, tükrük bezleri, segmentler arası kaslar, protorasik bezler, yağ doku ve ipek bezleri gibi larvaya özgü dokular, programlı hücre ölümü ile yeniden şekillenmekte ya da dejenere olmaktadır (Kakei et al., 2005). Çalışmamızda larvaya özgü doku olan posterior ipek bezi incelenmiştir. Posterior ipek bezi larval-pupal metamorfoz sırasında otofaji ve apoptoz hücre ölümleri ile dejenere olmaktadır (Montali et al., 2017). Çalışmamızda, literatür taramaları sonucunda belirlenen ve otofaji ile ilgili araştırmalarda kullanılan otofaji inhibitörü klorokuin uygulanmış ve sonrasında meydana gelen değişimler morfolojik ve biyokimyasal açıdan araştırılmıştır.

Klorokuin, günümüzde sıtma, romatoid artrit, lupus eritematozus gibi hastalıkların tedavisinde ve kanser ile ilgili klinik araştırmalarda kullanılan bir otofaji inhibitörüdür. Klorokuin, bafilomisin A1 ve pepstatin A gibi otofajiyi geç evrede inhibe etmektedir. Lizozom proteazlarını ve otofagozom-lizozom birleşmesini engelleyerek otofajiyi baskılamaktadır (Donohue et al., 2011; Liang et al., 2014).

Çalışma sırasında elde ettiğimiz morfolojik bulgularda, kontrol grubunun posterior ipek bezinde meydana gelen değişimler, 5. larval evrenin 9. gününde başlamaktadır (Şekil 3.1.d). 10. günden itibaren nukleusların piknotik hale geldiği, sitoplazma içeriğinin gittikçe yoğunlaştığı ve hücrelerde küçülmenin meydana geldiği belirlenmiştir. Bezin yapısında gözlenen tüm bu morfolojik değişimler tip 1 programlanmış hücre ölümü (apoptozis)'nün gerçekleştiğini göstermektedir. Hücre sitoplazmasında, özellikle pupal evreden itibaren belirlenen vakuollerin otofajik vakuoller olduğu düşünülmektedir (Şekil 3.1.g).

Posterior ipek bezi ile ilgili gerçekleştirilen araştırmalarda, dejenerasyon sürecinin otofaji ve apoptoz mekanizmaları ile meydana geldiğini belirten bir çok yayın mevcuttur. Matsuura et. al., (1968) posterior ipek bezi ile yaptıkları çalışmada, larval-pupal metamorfoz sırasında, ipek bezi hücrelerinde otofajiye ait otofagosom yapılarının oluşumunun erken pupa aşamasında tetiklendiğini, yapmış oldukları incelemeler sonucu rapor etmişlerdir (Matsuura et al.,1968). Li et al., (2010) *Bombyx mori* posterior ipek bezi ile gerçekleştirdikleri incelemelerde,

otofajik özelliklerin larvanın gezinme (5. instar 7.gün) ve örme (5.instar 8.gün) dönemlerinde görülmeye başlandığı, apoptotik cisimler ve DNA fragmentasyonu gibi apoptoza ait özelliklerin ise prepupal (5.instar 10.gün) ya da erken pupa evrelerinde ortaya çıktığını bildirmişlerdir (Li et al., 2010). İpek bezinin posterior kısmı ile yapılan başka bir çalışmada da, Atg genlerinin transkripsiyonunun örme aşamasında aktifleştiği ve pupal safhanın ilk gününe kadar otofajinin devam ettiği belirtilmiş, yapılan TEM analizlerinde de örme aşamasında otofagozomların varlığının tespit edilmesi ile sonuç desteklenmiştir. Bununla birlikte, efektör kaspaz aktivitesinin prepupal döneme kadar düşük olduğu, posterior ipek bezinin tamamen dejenere olmasından hemen önce, pupa aşamasının erken safhasında aktivitesinin arttığı belirtilmiştir. Tüm bunlara paralel olarak, ipek bezinin morfolojisinde meydana gelen değişimlerin, örme aşamasının sonunda (5. instar 9.gün) başladığı ve pupa aşamasının erken döneminden itibaren morfolojik değişimlerin daha da belirginleştiği, sitoplazma ve çekirdek yoğunlaşmasının çokca arttığı, pupa evresinde ise lümen sınırının ayırt edilemediği, sitoplazmanın düzensizleştiği, çekirdeklerin yoğunlaştığı ve parçalandığı, böylece bezin dejenerasyonunun tamamlandığı gerçekleştirilen ışık ve elektron mikroskobu incelemeleri sonrası rapor edilmiştir (Montali et al., 2017).

Manduca sexta'da, larval-pupal metamorfoz sırasında, labial bezde programlı hücre ölümünün meydana geldiği ve bu ölüm tipinin % 90 otofajik hücre ölümünün özelliklerine sahip olduğu, yapılan elektron mikroskobu çalışmalarıyla çok sayıda otofajik vakuollerin gösterilmesi ile belirlenmiştir (Lockshin and Zakeri, 2004). Muller et al., (2004) *Manduca sexta* larval yağ dokusu üzerine yaptıkları çalışmada, apoptoz ve otofajik hücre ölümünü araştırmışlardır. Işık ve elektron mikroskobu ile gerçekleştirilen incelemelerde, apoptotik hücre ölümüne ait işaretlere (hücrelerin ve çekirdeklerin büzülmesi, apoptotik cisimcikler, çekirdeklerde kromatin yoğunlaşması, hücreler arası bağlantıların kopması,...) rastlamamışlardır. Araştırmacılar, larval yağ dokusunun bozulması sürecinde görülen hücre ölümünün, otofajik hücre ölümü olduğunu ve 5. larval evrenin 6. gününde, gezinme aşamasının erken döneminde meydana gelen DNA kırıkları dışında, apoptoza dair bir kanıtın bulunamadığını belirtmişlerdir (Muller et al., 2004). Yapılan literatür çalışmaları sonucunda, elde edilen morfolojik bulgulara benzer veriler farklı çalışmalarda da gösterilmiştir.

Göncü ve Parlak (2008), *Bombyx mori* anterior ipek bezi ile yaptığı çalışmada, larval- pupal deri değişiminin meydana geldiği 10. günde, hücrelerde küçülmenin meydana geldiğini, hücre içeriğinde yoğunlaşmanın arttığını ve sitoplazma içerisinde vakuollerin görülmeye başlandığını, ancak otofajik vakuollerde önemli artışın pupalaşma ve sonrasında meydana geldiğini belirtmiştir. Bunun yanında larval- pupal metamorfoz sırasında gerçekleşen anterior ipek bezinin dejenerasyonunda, otofaji ile birlikte apoptozun da rol aldığını gösteren bulgulara rastlamışlardır. Agaroz jel elektroforezi ile larva-pupal deri değişiminden sonra apoptozisin biyokimyasal işareti olan DNA fragmentasyonunun meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca anterior ipek bezlerinin programlanmış hücre ölümü sürecinde, kaspaz benzeri enzim aktivitelerinin gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Göncü ve Parlak, 2008). *Bombyx mori* ile yapılan bir diğer çalışmada, larval-pupal metamorfoz sırasında, periferik yağ dokusunda meydana gelen programlı hücre ölümü araştırılmıştır. Elektron mikroskobu ile yapılan morfolojik değerlendirmelerde, apoptoza dair bulgulara rastlanmadığı ancak örme davranışının 2. gününde otofagozomların şekillenmeye başladığı gözlenmiş, böylece bu hücrelerde otofajik programlı hücre ölümünün gerçekleştiği belirtilmiştir. Pupanın sıfırncı (P0) gününde otofagozomların biriktiği, pupanın 1. gününde ise otofagozomlar ile lizozomların birleştiği, ilerleyen saatlerde ise otofajik vakuollerin sindirildiği bildirilmiştir. Elektron mikroskobu dışında yapılan analizlerde ise pupanın 1. gününde kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimler ve DNA kırıkları gibi apoptotik hücre ölümüne ait özelliklere rastlandığı rapor edilmiştir (Sumithra et al., 2009; Li et al., 2011).

Bombyx mori anterior ipek bezinde, otofaji bağlantılı genler ile ilgili incelemeler yapmışlardır. Elde ettikleri verilerde, otofaji bağlantılı genlerin (BmAtg5, BmAtg6, BmAtg8, BmAtg12) gezinme döneminde ve prepupal evrede en yüksek ekspresyon seviyelerine ulaştıkları, bunun yanında bu genlerin ekspresyon zamanlamalarının morfolojik bulgularla da tutarlı olduğunu bildirmişlerdir. Ulaşılan bu sonuçlar doğrultusunda, bu genlerin anterior ipek bezinin parçalanmasında rol oynadıkları tespit edilmiştir (Li et al., 2011). Programlı hücre ölümü ile ilgili yapılan başka bir çalışma da, *Galleria mellonella* yağ dokusunda gerçekleştirilmiştir. Transmisyon elektron mikroskobu ile gerçekleştirilen incelemelerde, pupal safhada, sitoplazma içerisinde çift zarlı

otofajik vakuollere, fagofor yapılarına ve otolizozomlara rastlandığı belirtilmiştir (Tınartaş, 2018).

Uygulama gruplarının morfolojilerini incelediğimizde, kontrole kıyasla programlanmış hücre ölümüne ait belirteçlerin geç görüldüğü, 12. günde ipek bezinin dejenerasyonunun gerçekleşmediği (Şekil 3.1.n,o), özellikle 3 mg uygulamasının 12. gününde hücreler içerisinde otofajik vakuollerin biriktiği görülmüştür (Şekil 3.2.o). Son larval evrenin hem 7. hem de 8. günlerinin klorokuin uygulamasına hassas olduğu belirlenmiştir. Klorokuin uygulamasına yönelik böceklerde yapılan çalışmalar son derece azdır. Romanelli et al., (2016), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, *Bombyx mori* larvalarına, otofaji aktivasyonunun başlangıcında, 1 mg klorokuin enjekte etmişlerdir. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizi ile elde ettikleri verilerde, klorokuin uygulaması sonrası orta bağırsak hücrelerinde veziküllerin biriktiği, bu veziküllerin boyutlarına, morfolojilerine ve içeriklerine bakıldığında, otofajik olarak adlandırılabilceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, Atg8-PE seviyeleri ile asit fosfataz aktivitesinin klorokuin uygulanan larvalarda artması sonucu, klorokuinin otofajiyi engellediği ve böylece, orta bağırsak hücrelerinde otofagozom ile lizozomların biriktiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, yeni pupal epitel morfolojisinin, klorokuin uygulanan larvalarda değişmediği, larval epitel organizasyonunun ise tamamen farklı olduğunu rapor etmişlerdir (Romanelli et al., 2016).

Klorokuin ile yapılan kanser çalışmalarında, klorokuinin hücelere olan etkisinin doza ve zamana bağlı olarak gerçekleştirdiğini, klorokuinin kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini ve hücre ölümünü uyardığını, sonuçta da kanser hücrelerinin yok olduğunu göstermiştir (Zheng et al., 2009). Zaidi et al., (2001) fareden elde ettikleri telansefalik nöronal kültürleri, klorokuin ile muamele etmiş ve etkilerini araştırmışlardır. Klorokuinin uygulama zamanı ve dozu ile ilişkili olarak, otofagozom yapılarının birikmesine, kaspaz 3'ün aktivasyonuna ve hücre ölümüne neden olduğu bulunmuştur. Işık mikroskobu ve ince yapı analizleri ile elde edilen bulgularda da, hücrede hem otofajik hem de apoptotik hücre ölümüne ait belirteçlerin gözlenmesi ile birlikte, klorokuin ile uyarılan nöronal ölümün her iki hücre ölüm tipi ile gerçekleştiği tespit edilmiştir (Zaidi et al., 2001). Fare kolon kanseri hücre hattı CT26 üzerinde klorokuin ile gerçekleştirilen

çalışmada, klorokuinin uygulanan zaman ve konsantrasyon miktarına göre, hücrelere olan etkisini araştırmışlardır. Düşük dozda uygulanan klorokuinin zamana bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğu, doz miktarının artması ile hücre büyümesini engellediği ve floresan mikroskobu ile yapılan incelemelerde de apoptozu uyardığı belirtilmiştir. Bunun yanında klorokuinin antitümör aktivitesini incelemek için, CT26 taşıyan BALB/c farelerine belirli dozlarda klorokuin uygulanmıştır. Klorokuinin güçlü bir antitümör aktivitesi sergilediği ve tümörün ilerlemesini engellediği bulunmuştur. Kontrol ile klorokuin uygulanan fareleri incelediklerinde, tümörün baskılanması ile farelerin yaşam sürelerinin kontrole kıyasla uzadığı belirtilmiştir (Zheng et al., 2009). Benzer çalışma primer efüzyon lenfoma (PEL) hücrelerinde de yapılmıştır. Klorokuin uygulaması yapılan bu çalışmada da, uygulanan doz ve miktara bağlı olarak, PEL hücrelerinde büyümeyi engellediği, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olduğu, hücre canlılığında belirgin bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca otofajinin engellenmesi ile hücrede ER stres kaynaklı kaspaz bağımlı apoptozu uyardığı tespit edilmiştir (Alam et al., 2016). Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda ise klorokuin uygulaması posterior ipek bezinin dejenerasyonunda apoptozisin morfolojik belirteçleri olan nuklear yoğunlaşma, hücrelerde büzülme ve hücre sınırlarının düzensizleşmesi gibi olayların engellenmediği ancak apoptozis düzeyinde de kontrol grubundan farklılık olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte uygulama gruplarında otofajik vakuollerin birikimi, asit fosfataz enzim aktivitelerinin düşük bulunması ve kontrol grubundaki gibi bezin dejenerasyonunun tamamlanmaması klorokuinin posterior ipek bezinde otofajiyi inhibe ettiğini ve bunun sonucunda dejenerasyonun tamamlanmasını önlediğini göstermektedir.

Elde edilen asit fosfataz sonuçlarında, kontrol grubunda prepupal dönemde enzim aktivitesinin düşük olduğu, larval-pupal metamorfoz sonrası meydana gelen pupal dönemde ise enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.5). Bu sonuçlar, pupal dönemde ipek bezinin dejenerasyonunda apoptoz ile birlikte otofajik hücre ölümünün de rol oynadığını kanıtlamaktadır. *Bombyx mori* periferik yağ dokusunda, programlı hücre ölümü ile ilgili yapılan çalışmada, lizozomal asit fosfataz aktivitesinin giderek arttığı, pupal safhanın 1. gününde ise en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (Sumithra et al., 2009). Montali et al., (2017)

Bombyx mori posterior ipek bezinde yaptıkları çalışmalarda, örme aşamasından itibaren asit fosfataz aktivitesinin arttığını ve otofajinin pupa evresinin ilk gününe kadar aktif olduğunu göstermişlerdir. Tınartaş (2018), gerçekleştirmiş olduğu çalışmada, *Galleria mellonella* yağ dokusunda, pupal safha boyunca asit fosfataz enzim aktivitesinde artış gözlemlendiğini ve bu safhanın son günlerinde ise enzim miktarında artışın en üst seviyeye ulaştığını rapor etmiştir (Tınartaş, 2018). Bizim ulaştığımız sonuçlarda bu bilgileri desteklemektedir.

Klorokuin uygulama gruplarında kontrol grubuna oranla enzim aktiviteleri azalmıştır (Şekil 3.5., Şekil 3.7). Bunun sebebinin ise klorokuin'nin, ortamdaki pH'ı arttırarak lizozomal enzimlerin aktivitesini engellediği, böylece lizozomlar ile otofagozomların birleşmesini önlediği düşünülmektedir. Bu sonuçlarla benzerlik gösteren başka çalışmalarda mevcuttur. Yamamoto et al., (1998) sıçan hepatoma hücre hattı olan H-4-II-E hücrelerinde yaptıkları çalışmada, klorokuin gibi geç evre otofaji inhibitörü olan bafilomisin A1' in etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla, asit fosfataz aktivitesini elektron mikroskopik seviyede incelemişler ve sitoplazmada biriken otofagozomlarda, asit fosfataz aktivitesine rastlamamışlardır. Bunun nedeninin ise, bafilomisin A1' in, otofagozomlar ile lizozomların birleşmesini inhibe ederek, otofagozomların otolizozomlara olgunlaşmasını önlediğini ve endojen protein yıkımını etkin bir şekilde inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Yamamoto et al., 1998).

Uygulama gruplarında belli günlerde asit fosfataz enzim aktivitesi kontrole kıyasla yüksek bulunmuştur. Bunun nedeninin ise lameller cisimciklerin oluşumu olduğu düşünülmektedir. Lameller cisimcikler, salgı lizozomları olarak adlandırılan lizozom bağlantılı organellerin bir alt sınıf üyeleridir. Lizozom ve birçok lizozom bağlantılı organellerle benzer olarak, çözülebilir enzimler (asit fosfataz, katepsinler C ve H) ile proteinler (CD63/LAMP3 VE LAMP1) içermektedirler. Lameller cisimcikler, asidik (pH:~ 5.5) bir iç ortama sahip olup, çok lamelli lipit zarları içermektedirler. Hücrede fosfolipitlerin depolanmasında ve salgılanmasında görev almaktadırlar (Schmitz and Müller, 1991; Weaver et al., 2002). Schmitz and Müller (1991), sinir ve beyin dokusunun dejeneratif işlemleri sırasında, lameller cisimciklerin oluştuğunu, bunun nedeninin ise, hücre içi lipit taşınımının hatalı olması veya hücrelerde meydana gelen otofajik aktiviteler yüzünden olabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, lizozomların içinde

biriken ve lizozomal pH'in artmasına yol açan ilaçların kullanılması sonucu, lizozomlarda, hem otofajik hem de heterofajik süreçler ile biriken fosfolipitlerin metabolizmasını engellediği, bundan dolayı lamellar cisimlerin aşırı yığılmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Schmitz and Müller, 1991). Benzer bir çalışma da klorokuinin, lizozomal enzim aktivitesini engellediği, bundan dolayı glikojen ile fosfolipitlerin birikmesine yol açtığı, bu birikmenin ise hücrede lameller cisimlerin oluşmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Halliwell, 1997; Naqvi et al., 2005). Ayrıca lameller cisimlerin pozitif asit fosfataz aktivitesi sergilediği de başka bir yayında belirtilmiştir (Joshi et al., 1989). Fischer and Nelson, civcivler ile gerçekleştirdikleri çalışmada, klorokuin uygulaması yapmışlar ve uygulama sonrası civciv endotel hücrelerinde, asit fosfataz aktivitesinin arttığı, purkinje, granül ve endotel hücrelerinin sitoplazmalarında ise lameller cisimlerin giderek biriktiği tespit edilmiştir (Fischer and Nelson, 1974). Farklı hayvan türleri ile yapılan deneylerde de, klorokuinin, karaciğer, akciğer, lökositler, ekzokrin pankreas, periferik sinirler ve duyuşal gangliyon gibi çeşitli doku ve hücrelerde genel olarak lameller cisimlerin oluşumunu uyardığı bulunmuştur (Lüllmann et al., 1975).

Çalışmamızda ayrıca, klorokuin uygulama sonrası, ipek böceklerinin larval-pupal deri değişimini gerçekleştiremedikleri ve 12. günden sonra öldükleri görülmüştür. Nedeninin ise, otofajinin engellenmesinden dolayı olabileceği düşünülmektedir. *Drosophila*'daki dokularda otofajik hücre ölümü, hayvanın beslenmeyi bıraktığı zamanda meydana gelmektedir. Dolayısıyla metamorfoz sırasında, yetişkin yapılarının gelişmesi, hücre için gerekli olan enerjinin sağlanması ve organizmanın hayatta kalmasının otofaji mekanizması ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bundan dolayı Atg genlerinde meydana gelen mutasyonlar ya da otofajinin engellenmesi durumu pupa için ölümcül olabilmektedir (Tracy and Baehrecke, 2013). *Diabrotica virgifera virgifera* orta bağırsak enterositlerinde yapılan çalışmada, gen susturma ile, otofagozom-lizozom birleşmesinin gerçekleşmediği, büyük lizozomlar ile çok lamelli cisimleri içeren düzensiz makrotofajik yapıların ortaya çıktığı ve membran bütünlüğünün bozulduğu dolayısıyla otofajinin engellendiği ve hayvanın öldüğü belirtilmiştir (Koçi et al., 2014).

Sonuç olarak; gerçekleştirilen bu çalışmada, larval- pupal metamorfoz sürecinde posterior ipek bezinde meydana gelen programlı hücre ölümünde otofajinin rolünün anlaşılması için klorokuin uygulaması yapılmış ve etkileri incelenmiştir. Klorokuin uygulaması posterior ipek bezlerinde otofajik süreci engellemiştir. Bunun sonucunda posterior ipek bezinin dejenerasyon süreci tamamlanmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bezin dejenerasyonunda otofajinin önemini açıkça ortaya koymakta ve tek başına apoptozisin bezin ortadan kaldırılmasında yeterli olmadığını göstermektedir. Prepupal dönemde otofajinin inhibisyonunun pupal deri değişimini de engellemesi; larval-pupal metamorfoz sürecinin sağlıklı gerçekleşmesinde otofajinin önemini açıkça göstermektedir. Aynı zamanda bu sonuçlar, klorokuinin böceklerde otofajiye ilişkin çalışmalarda kullanılmasına ilişkin potansiyelini gözler önüne sermektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Alam, M. M., Kariya, R., Kawaguchi, A., Matsuda, K., Kudo, E., & Okada, S., 2016, Inhibition of autophagy by chloroquine induces apoptosis in primary effusion lymphoma in vitro and in vivo through induction of endoplasmic reticulum stress, *Apoptosis*, 21(10): 1191-1201 pp.

Arslan, D. Ö., Korkmaz, G., & Gözüaçık, D., 2011, Otofaji: Bir hücresele stres yanıtı ve ölüm mekanizması, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(4):184-194 ss.

Badadani, M., 2012, Autophagy mechanism, regulation, functions, and disorders, *ISRN Cell Biology*, 2012.

Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., and Grassl, M., 1974, in *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, Inc., New York, NY. Vol (1-2): 495-496 pp.

Bradford, M. M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254 pp.

Dai, J. D., & Gilbert, L. I., 1998, Juvenile hormone prevents the onset of programmed cell death in the prothoracic glands of *Manduca sexta*, *General and comparative endocrinology*, 109(2): 155-165 pp.

Donohue, E., Tovey, A., Vogl, A. W., Arns, S., Sternberg, E., Young, R. N., & Roberge, M., 2011, Inhibition of autophagosome formation by the benzoporphyrin derivative verteporfi, *Journal of Biological Chemistry*, 286(9): 7290-7300 pp.

Dubrovsky, E. B., 2005, Hormonal cross talk in insect development, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(1): 6-11 pp.

Eymen, U. E., 2007, SPSS 15.0 veri analiz yöntemleri, *İstatistik Merkezi Yayın*, (1):109-113 ss.

Fan, C., Wang, W., Zhao, B., Zhang, S., & Miao, J., 2006, Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(9): 3218-3222 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Fischer, V. W., & Nelson, J. S., 1974, Chloroquine-enhanced cerebellovascular changes in nutritionally imbalanced chicks, *Acta neuropathologica*, 29(1): 65-72 pp.

Goldsmith, Marian, R., Shimada, Toru & Abe, Hiroaki., 2004, The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*, *Annu. Rev. Entomol.*, 50: 71- 100 pp.

Goncu, E., & Parlak, O., 2008, Some autophagic and apoptotic features of programmed cell death in the anterior silk glands of the silkworm, *Bombyx mori*, *Autophagy*, 4(8): 1069-1072 pp.

Göncü, N. E., 2006, İpek Böceği *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) Anterior İpek Bezinde Programlanmış Hücre Ölümüne Juvenil Hormon Analogu Fenoxycarb'ın Etkisi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi), İzmir, 17-29 ss.

Gözüaçık, D., 2011, Otofaji analiz yöntemleri ve uygulama aşamaları, *Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri*, 129-141 ss.

Grzelak, K., Szczesna, E., & Sehnal, F., 1982, Stimulation of RNA transcription by juvenile hormone in degenerating silk glands, *Molecular and cellular endocrinology*, 26(3): 341-351 pp.

Gullan, P. J., & Cranston, P. S., 2010, The insects: an outline of entomology fourth edition, John Wiley & Sons, 64-65 pp.

Halaby, R., Martinez, M. L., Lockshin, R. A., & Zakeri, Z., 2003, 20-Hydroxyecdysone induces apoptosis in the labial gland of *Manduca sexta*, *J Res Lepid*, 37(1): 3-10 pp.

Halliwell, W. H., 1997, Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis, *Toxicologic pathology*, 25(1): 53-60 pp.

Hou, Y., Xia, Q., Zhao, P., Zou, Y., Liu, H., Guan, J., Gong, J., & Xiang, Z., 2007, Studies on middle and posterior silk glands of silkworm (*Bombyx mori*) using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(5): 486-496 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

International Silkworm Genome Consortium., 2008, The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*, *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(12): 1036-1045 pp.

İzzetoğlu, G. T., Özkorkmaz, F., Zeka, Ö., & Öber, A., 2009, İpekböceği (Bombycidae: *Bombyx mori*)'nde juvenil ve ekdizon hormonları uygulaması sonucu olası değişimler, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15(4): 525-530 ss.

Jacobson, M. D., Weil, M., & Raff, M. C., 1997, Programmed cell death in animal development, *Cell*, 88(3): 347-354 pp.

Jiang, C., Baehrecke, E. H., & Thummel, C. S., 1997, Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis, *Development*, 124(22): 4673-4683 pp.

Joshi, U. M., Rao, P., Kodavanti, S., Lockard, V. G., & Mehendale, H. M., 1989, Fluorescence studies on binding of amphiphilic drugs to isolated lamellar bodies: relevance to phospholipidosis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1004(3): 309-320 pp.

Kakei, M., Iwami, M., & Sakurai, S., 2005, Death commitment in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*, *Journal of insect physiology*, 51(1): 17-25 pp.

Kamimura, M., & Kiuchi, M., 1998, Effects of a Juvenile Hormone Analog, Fenoxycarb, on 5th Stadium of the Larvae of the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera:Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 33 (2): 333-338 pp.

Karadağ, A., 2016, Otofaji: Programlı Hücre Ölümü, *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 15(2): 20-26 ss.

Koçi, J., Ramaseshadri, P., Bolognesi, R., Segers, G., Flannagan, R., & Park, Y., 2014, Ultrastructural changes caused by Snf7 RNAi in larval enterocytes of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte), *PLoS One*, 9(1): e83985.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Li, Q., Deng, X., Yang, W., Huang, Z., Tettamanti, G., Cao, Y., & Feng, Q., 2010, Autophagy, apoptosis, and ecdysis-related gene expression in the silk gland of the silkworm (*Bombyx mori*) during metamorphosis, *Canadian Journal of Zoology*, 88(12): 1169-1178 pp.

Li, Q., Deng, X., Huang, Z., Zheng, S., Tettamanti, G., Cao, Y., & Feng, Q., 2011, Expression of autophagy-related genes in the anterior silk gland of the silkworm (*Bombyx mori*) during metamorphosis, *Canadian journal of zoology*, 89(11): 1019-1026 pp.

Liang, X., Tang, J., Liang, Y., Jin, R., & Cai, X., 2014, Suppression of autophagy by chloroquine sensitizes 5-fluorouracil-mediated cell death in gallbladder carcinoma cells, *Cell & bioscience*, 4(1): 10 p.

Lockshin, R. A., & Zakeri, Z., 2004, Apoptosis, autophagy, and more, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12): 2405-2419 pp.

Lüllmann, H., Lüllmann-Rauch, R., Wassermann, O., & de la Iglesia, F. A., 1975, Drug-induced phospholipidoses, *CRC critical reviews in toxicology*, 4(2): 185-218 pp.

Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G., 2007, Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9): 741 pp.

Matsuura, S., Morimoto, T., Nagata, S. and Tashiro, Y., 1968, Studies on the Posterior Silk Gland of the Silkworm, *Bombyx mori* II. Cytolytic Process in Posterior Silk Gland Cells during Metamorphosis from Larva to Pupa, *The Journal of Cell Biology*, 38(3): 589-603 pp.

Mondal, M., 2007, The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn.,-a review, *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 5(2): 63-76 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Montali, A., Romanelli, D., Cappellozza, S., Grimaldi, A., de Eguileor, M., & Tettamanti, G., 2017, Timing of autophagy and apoptosis during posterior silk gland degeneration in *Bombyx mori*, *Arthropod structure & development*, 46(4): 518-528 pp.

Muller, F., Ádori, C., & Sass, M., 2004, Autophagic and apoptotic features during programmed cell death in the fat body of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*), *European journal of cell biology*, 83(2): 67 p.

Naqvi, T. Z., Luthringer, D., Marchevsky, A., Saouf, R., Gul, K., & Buchbinder, N. A., 2005, Chloroquine-induced cardiomyopathy-echocardiographic features, *Journal of the American Society of Echocardiography*, 18(4): 383-387 pp.

Parker, S.M., 1982, Synopsis and classification of living organisms., Ed. by Sybil, P. Parker, Mc Graw-Hill, Inc, USA.

Parlak, O., 2001, İpekböceği Biyolojisi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları: No:171.

Riddiford, L. M., 1985, Hormone action at the cellular level, *Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology*, 8: 37-84 pp.

Romanelli, D., Casartelli, M., Cappellozza, S., De Eguileor, M., & Tettamanti, G., 2016, Roles and regulation of autophagy and apoptosis in the remodelling of the lepidopteran midgut epithelium during metamorphosis, *Scientific reports*, 6: 32939.

Sahin, Y., & Yıldız, D. A., 2017, Memeli hücrelerinde otofajinin moleküler mekanizması, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(2): 205-218 ss.

Sakurai, S., & Imokawa, H., 1988, Developmental arrest induced by juvenile hormone in larvae of *Bombyx mori*, *Archives of insect biochemistry and physiology*, 8(4):219-228 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Şencan, S., 2015, Otofajinin Kanserdeki Rolü, Doktora Tezi, T.C. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 86s (yayımlanmamış).

Schmitz, G., & Müller, G., 1991, Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids, *Journal of lipid research*, 32(10): 1539-1570 pp.

Sumithra, P., Chandrasekhar, R., & Krishnan, M., 2009, Autophagic programmed cell death in the peripheral fat body tissues of the silk worm, *Bombyx mori* L, *Short view on insect molecular biology*, 1: 159-173 pp.

Tashiro, Y., Morimoto, T., Matsuura, S., & Nagata, S., 1968, Studies on the Posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*: I. Growth of posterior silk gland cells and biosynthesis of fibroin during the fifth larval instar, *The Journal of cell biology*, 38(3): 574-588 pp.

Terashima, J., Yasuhara, N., Iwami, M., Sakurai, S., & Sakurai, S., 2000, Programmed cell death triggered by insect steroid hormone, 20-hydroxyecdysone, in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*, *Development genes and evolution*, 210(11): 545-558 pp.

Thorburn, A., 2008, Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes, *Apoptosis*, 13(1): 1-9 pp.

Tınartaş, E. P., 2018, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Yağ Dokusunda Programlanmış Hücre Ölümüne Juvenil Hormon Analogu Fenoksikarb'in Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, T.C Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 154s (yayımlanmamış).

Tian, L., Guo, E., Wang, S., Liu, S., Jiang, R. J., Cao, Y., Ling, E., & Li, S., 2010, Developmental regulation of glycolysis by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in fat body tissues of the silkworm, *Bombyx mori*, *Journal of molecular cell biology*, 2(5): 255-263 pp.

Tian, L., & Li, S., 2015, Autophagy studies in *Bombyx mori*, *ISJ-Invert Surviv J*, 12: 103-108 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tracy, K., & Baehrecke, E. H., 2013, The role of autophagy in *Drosophila* metamorphosis, In *Current topics in developmental biology*, 103: 101-125 pp.

Tsuzuki, S., Iwami, M., & Sakurai, S., 2001, Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis, *Insect biochemistry and molecular biology*, 31(4-5): 321-331 pp.

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., & Tashiro, Y., 1998, Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells, *Cell structure and function*, 23(1): 33-42 pp.

Zaidi, A. U., McDonough, J. S., Klocke, B. J., Latham, C. B., Korsmeyer, S. J., Flavell, R. A., Schmidt, R. E., & Roth, K. A., 2001, Chloroquine-induced neuronal cell death is p53 and Bcl-2 family-dependent but caspase-independent, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(10): 937-945 pp.

Zheng, Y., Zhao, Y. L., Deng, X., Yang, S., Mao, Y., Li, Z., Jiang, P., Zhao, X., & Wei, Y., 2009, Chloroquine inhibits colon cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo via induction of apoptosis, *Cancer investigation*, 27(3): 286-292 pp.

Weaver, T. E., Na, C. L., & Stahlman, M., 2002, Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant, *Seminars in cell & developmental biology*, 13(4): 263-270 pp.

TEŞEKKÜR

Gerçekleştirmiş olduğum tez çalışması boyunca yardımlarını ve bilgilerini benden esirgemeyen, beni yönlendiren, her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ' ye, böcek yetiştirme döneminde yardımlarıyla katkı koyan sayın Dr. Öğr. Üyesi Gamze TURGAY İZZETOĞLU'na, histolojik materyallerin görüntülenmesinde yardımcı olan sayın Prof. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN'e, sevgili çalışma arkadaşlarım Büşra GÜNAY ve Tuğçe ERGİN'e tezimin her aşamasında bana destek oldukları için teşekkür ederim.

Özellikle eğitim hayatım boyunca maddi-manevi destek olan, her zaman bana inanan, güvenen ve hep yanımda olan canım aileme çok teşekkür eder, şükranlarımı sunarım.

08 /03 / 2019

İmzası



Adı-Soyadı

Nurcan GÜRLER

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde doğdu. İlköğrenimini ve ortaöğrenimini KKTC'de tamamladı. 2011 yılında liseden mezun olduktan sonra aynı yıl Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünü kazandı. Burada 2 yıl eğitim aldıktan sonra, 2013 yılında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji bölümüne yatay geçiş yaptı. 2016 yılında Biyoloji bölümü, Zooloji Anabilim Dalı'ndan mezun oldu. 2017 yılında, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji bölümünde yüksek lisans programına başladı. 2019 Mart ayında tez çalışmasını bitirdi.

