

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İPEK BÖCEĞİ *BOMBYX MORI*'NİN ORTA BARSAK
KÖK HÜCRELERİNDE, LARVAL-PUPAL
METAMORFOZ SÜRECİNDE OTOFAJİNİN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Büşra GÜNAY

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 13.08.2018

**Bornova – İZMİR
2018**

Büşra GÜNAY tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**İpek böceği *Bombyx mori*'nin orta bağırsak kök hücrelerinde, larval-pupal metamorfoz sürecinde otofajinin rolünün 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 **13.08.2018** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.


Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr Ebru GÖNCÜ



Raportör Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gamze TURGAY İZZETOĞLU



Üye : Prof. Dr. 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 “**İpek böceği *Bombyx mori*'nin Orta Barsak Kök Hücrelerinde, Larval-Pupal Metamorfoz Sürecinde Otofajinin Rolünün Araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğumu, 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.

13 / 08 / 2018

İmza



Adı-Soyadı

Büşra GÜNAY

ÖZET

**İPEK BÖCEĞİ *BOMBYX MORI*'NİN ORTA BARSAK KÖK
HÜCRELERİNDE, LARVAL-PUPAL METAMORFOZ SÜRECİNDE
OTOFAJİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

GÜNAY, Büşra

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nesrin Ebru GÖNCÜ

Ağustos, 2018

Tam başkalaşım geçiren *Bombyx mori* ipek böceğinin orta bağırsağı larval-pupal metamorfoz sırasında yeniden şekillenme sürecine girmektedir. Larval orta bağırsak epitelinin olgun hücreleri otofaji ve apoptoz mekanizmaları ile tamamen dejenere olmaktadır. Larval kök hücreler büyüme, çoğalma, ve farklılaşma geçirerek pupal epitelin oluşumunu sağlamaktadır. Otofaji hücre içi makro moleküllerin ve organellerin yanlış katlanma, eskimiş olma, kullanılmama ve hasar görmesi durumlarında parçalanması ve yapı taşlarının geri kazanılmasını sağlayan hücre içi geri dönüşüm mekanizmasıdır. Otofaji kök hücrelerin kendini yenilemesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan kritik bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bu süreçlerde kök hücrelerdeki en önemli mekanizmanın otofaji olduğu düşünülmektedir. Hücrelere yeniden şekillenme sürecinde besin ve enerji kaynağı sağlamaktadır. Bu çalışmada *Bombyx mori*'de pupal orta bağırsağı oluşturan kök hücrelerde otofaji mekanizmasının rolü araştırılmıştır.

Bu amaçla 5. larval evrenin farklı günlerinde ve dozlarda klorokuin uygulaması enjeksiyon yolu ile gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamalar sonrası morfolojik ve biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Otofaji mekanizmasının baskılanması larval-pupal deri değişimini engellemiş ve *Bombyx mori*'nin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca otofaji mekanizması klorokuin ile

engellendiğinde kök hücrelerde çoğalma oranının azaldığı ve farklılaşmanın engellendiği gözlenmiştir. Otofajinin, kök hücrelerin hem çoğalma hem de farklılaşma süreçlerinin başlangıcında önemli rolleri olabileceğine ilişkin güçlü kanıtlar elde edilmiştir. Özellikle memeli ve böcek kök hücrelerinin benzerliklerinden dolayı, elde edilen sonuçlar sadece böcek fizyolojik çalışmalarında değil tür farkı gözetmeksizin farklı kök hücrelerinin biyolojilerinin anlaşılmasına da katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: *Bombyx mori*, orta bağırsak, kök hücre, otofaji



ABSTRACT**INVESTIGATION THE ROLE OF AUTOPHAGY IN MIDGUT
STEM CELLS OF SILKWORM *BOMBYX MORI*, DURING
LARVAL-PUPAL METAMORPHOSIS****GÜNAY, Büşra****MSc in Biology****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru GÖNCÜ****February 2018**

Midgut of silkworm *Bombyx mori* which passes complete metamorphosis, go into remodelling timing during larval-pupal metamorphosis. Mature cells of larval midgut epithelium is completely deenerated with apoptosis and autophagy mechanisms. Larval stem cells lead to formation of pupal epithelium passing growing, proliferating and differentiation. Autophagy is intracellular recycling mechanism which leads in cases of false folding, being old, disused, damaged intracellular macro molecules and organel broken down and recovered of integral parts. It is thought that autophagy which provides self-renewal, proliferating and differentiation of stem cells, is a critical mechanism. It is supposed that, in these processes, autophagy is the most important mechanism in stem cells. This provides food and energy source during remodelling into cells. In this study, autophagy mechanism's role was searched in stem cells which is formatted pupal midgut in *Bombyx mori*.

With this aim, it was realized in different days of 5. larval stage and different doses using chloroquine via injection. After these practices, it was performed morphological and biochemical analysis. Being inhibition of autophagy mechanism blocked larval-pupal molting and it was showed that causing death of *Bombyx mori*. Also, when Autophagy mechanism was blocked by chloroquine, proliferation ratio decreased in stem cells and seemed stopping of differentiation. It was obtained powerfull evidences of autophagy, stem cells in beginning of both proliferation and differentiation timing, may have important

roles. Due to similarity of mammals and insect stem cells, it will contribute, obtained results not only in insect physiology studies but also not looking out for difference of species different stem cells'biologies understanding.

Key words: *Bombyx mori*, midgut, stem cell, autophagy



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve ilerideki akademik hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ'ye teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Böcek yetiştirme döneminde ve sonraki aşamalarda her zaman bilgisiyle, güleryüzüyle yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Gamze TURGAY İZZETOĞLU'na, tez çalışmamdaki histolojik preparasyonun görüntülenmesinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN'e ve sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Esen POYRAZ TINARTAŞ, Tuğçe ERGİN ve Nurcan GÜRLER' e, çalışmamın her adımındaki yardımları, destekleri ve sabırlarından ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Maddi olarak tezimi 18-FEN-027 numaralı proje kapsamında destekleyen Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığına teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme, özellikle çok kıymetli eşim Mehmet GÜNAY ve benim yüksek lisans sürecim boyunca benimle birlikte büyüyen canım kızım İlke GÜNAY'a hayatıma kattıkları onca güzel şey için minnettarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
1.1.İpek Böceği (<i>Bombyx mori</i>).....	1
1.2.İpek Böceğinin Sindirim Sistemi.....	2
1.3.Orta Bağırsağın Yeniden Şekillenme Sürecinde Hormonal Regülasyon.....	5
1.4.Kök Hücrelerden Pupal Orta Bağırsağın Oluşumu.....	6
1.5.Kök Hücrelerde Otofaji.....	8
1.6.Klorokuin Uygulaması ile Otofajinin İnhibisyonu.....	12
2.MATERYAL ve METOD.....	13
2.1.İpek Böceğinin Temini ve Yetiştirilmesi.....	13
2.2.Deneyde Kullanılan Reaktif.....	14
2.3.Orta Bağırsağın Elde Edilmesi.....	15
2.4.Larval Orta Bağırsaktan Kök Hücre İzolasyonu.....	16
2.5.Histolojik Uygulamalar.....	16
2.5.1.Hematoksilen&Eosin boyama yöntemi.....	17

2.6.Biyokimyasal Yöntemler.....	18
2.6.1.Asit fosfataz enziminin aktivitesinin belirlenmesi.....	18
2.6.2.Total protein tayini (Bradford yöntemi).....	19
3.BULGULAR.....	20
3.1.Histolojik Bulgular.....	21
3.2.Asit Fosfataz Enzim Aktivitesi Bulguları.....	29
4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.Böceklerde sindirim kanalının 3 bölgeye ayrılmış görünümü.....	3
1.2.İpek böceğinde gelişim evreleri süresince sindirim sistemindeki değişiklikler.....	4
1.3.Otofaji mekanizması.....	9
3.1.İpek böceği <i>Bombyx mori</i> 'de larval-pupal metamorfoz boyunca kontrol grubu, 7.gün 1mg ve 3mg klorokuin uygulaması sonrasında, orta bağırsağın genel histolojik yapısı.....	24
3.2.İpek böceği <i>Bombyx mori</i> 'de larval-pupal metamorfoz boyunca kontrol grubu, 7.gün 1mg ve 3mg klorokuin uygulaması sonrasında, orta bağırsağın ayrıntılı histolojik yapısı	26
3.3.İpek böceği <i>Bombyx mori</i> 'de larval-pupal metamorfoz boyunca kontrol grubu, 8.gün 1mg ve 3mg uygulamasında, orta bağırsağın histolojik yapısı	27
3.5.İpek böceği <i>Bombyx mori</i> larval-pupal metamorfoz boyunca kontrol grubu, 7.gün 1mg ve 3mg uygulamasında, 5. larval evrenin 7., 8., ve 9. günlerinde belirlenen asit fosfataz enzim aktiviteleri.....	31
3.6.İpek böceği <i>Bombyx mori</i> , beşinci larval instarın 7. günü 1mg e 3 mg Klorokuin uygulaması sonucu kök hücre enzim aktiviteleri	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Şekil****Sayfa**

- 3.7.**İpek böceği *Bombyx mori*, beşinci larval instarın 8. günü 1 mg ve 3 mg Klorokuin uygulaması sonucu kök hücre enzim aktiviteleri..... 32
- 3.8.**İpek böceği *Bombyx mori*, beşinci larval instarın 7. ve 8. günü 1 mg ve 3 mg Klorokuin uygulaması sonucu kök hücre enzim aktivitelerinin33
- 3.9.**İpek böceği *Bombyx mori*, beşinci larval instarın 7. günü 1mg ve 3 mg Klorokuin uygulaması sonucu kök hücrelerden yeni oluşan pupal orta bağırsak hücrelerinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması 33
- 3.10.**İpek böceği *Bombyx mori*, beşinci larval instarın 8. günü 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulaması sonucu kök hücrelerden yeni oluşan pupal orta bağırsak hücrelerinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

2.1.*Bombyx mori* larval yaşam periyodu.....14

2.2.Deney grupları, kullanılan hayvan sayıları ve uygulanan reaktif
dozları.....15



1 GİRİŞ

1.1 İpek Böceği (*Bombyx mori*)

Arthropoda filumunun *Insecta* sınıfına dahil olan ipek böcekleri *Holometabola* üst takımı içindedir. *Holometabola* üst takımına dahil olan böceklerin yaşam döngüsü yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere fizyolojik ve morfolojik özellikleri farklı safhalardan oluşur. Larva evresi aktif beslenme ve büyüme evresidir. Pupal dönem larval dokuların dejenerasyonu, belli dokuların yeniden şekillenmeye uğradığı ve kök hücrelerden erginde fonksiyonel olacak dokuların oluştuğu yapılanma evresidir (Klowden, 2007).

Bombyx mori sistematığı, ‘Synopsis and Classification of living Organisms, S. P. Parker, 1983’ adlı esere dayanarak bu şekildedir;

Phylum : Arthropoda

Classis : Insecta

Subclassis : Pterygota

Süperordo : Holometabola

Ordo : Lepidoptera

Süperfamilia : Bombycoidea

Familia : Bombycidae

Genus : *Bombyx*

Species : *mori*

İpek böceği *Bombyx mori* küçük boyutlu olması ve laboratuvar şartlarında kolay kültüre edilebilmesi nedeniyle *Arthropoda* ve *Lepidoptera* biyolojisi çalışmalarında model organizma haline gelmiştir (Goldsmith et al., 2004). Özellikle böceklerde gelişimin hormonal kontrolünü göstermede en çok kullanılan böcek türüdür.

İpek böceklerinde metamorfoz sırasında meydana gelen bütün fizyolojik ve morfolojik değişimler endokrin sistem tarafından düzenlenmektedir. 3 farklı yaşam evresi boyunca homeostazisinin sağlanması, böceğin gelişimi ve davranışlarının düzenlenmesinde endokrin sistemin önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (Gilbert et al., 1980).

İpek böceği *Bombyx mori* özellikle biyoloji, fizyoloji ve endokrinolojide, çeşitli moleküler araçların kullanılabilirliğiyle ve tamamen dizisi belirlenmiş bir genom için mevcut olan artan bilgi birikimi sayesinde, genetik, genomik ve proteomik çalışmalar için önemli bir model haline gelmiştir (Goldsmith and Wilkins, 1995). Böceklerde birçok temel fizyolojik süreç evrim boyunca korunduğu için, ipek böceği üzerinde yapılan çalışmalar, morfogenez, endokrinoloji, üreme, davranış ve bağışıklık sistemine dair bilgilerin artmasına yardımcı olabilir (Romanelli et al., 2014). Bu nedenle metamorfoz sırasında meydana gelen gelişimsel süreçlerin moleküler regülasyonu ve morfolojik olayları hakkındaki bilginin artışı oldukça önemlidir.

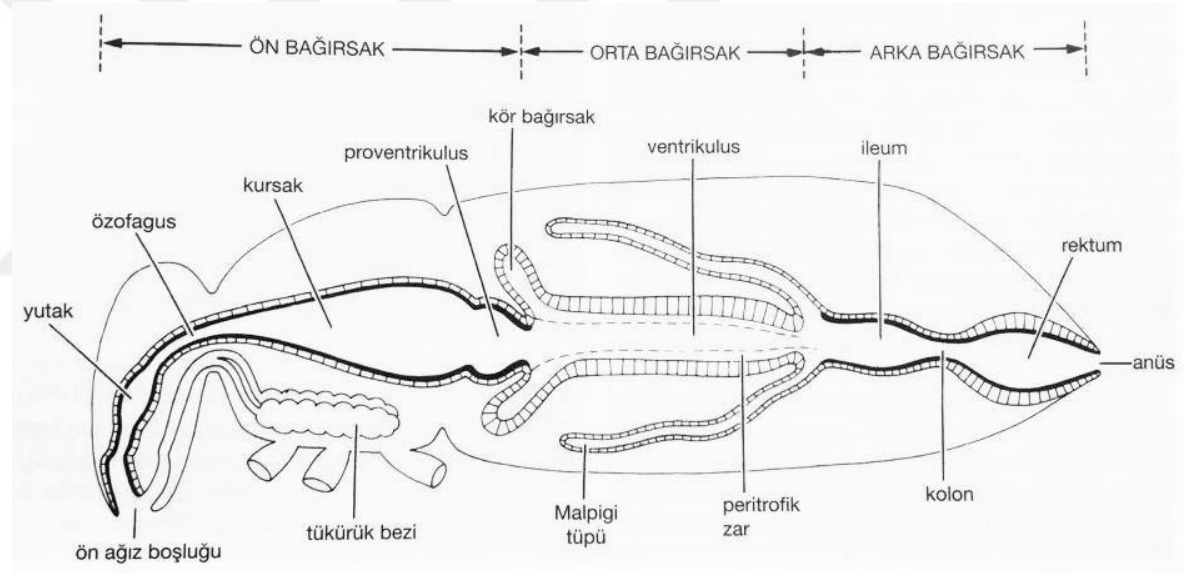
Böceklerde metamorfoz sırasında meydana gelen en önemli değişimlerden bir tanesi sindirim sisteminde hormonlara bağlı olarak gerçekleşen yeniden şekillenme işlemleridir. Bu süreç temel olarak iki farklı fizyolojik olay içerir. Larval evrede fonksiyonel olan larval orta bağırsak, programlanmış hücre ölümü yolu (PHÖ) ile uzaklaştırılırken pupal orta bağırsak kök hücreler tarafından oluşturulur (Malta et al., 2017). Kök hücrelerin biyolojisine ilişkin hem omurgasız hayvanlarda hem de omurgalı hayvanlarda yapılan çalışmalar özellikle son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Bu hücreler sahip oldukları çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri ve canlının yaşamı boyunca yer aldıkları doku ve organlarda sahip oldukları fonksiyonları açısından oldukça önemli hücrelerdir.

1.2 İpek Böceğinin Sindirim Sistemi

İpek böceği sindirim sistemi, ağız ile başlayıp anüs ile son bulmaktadır. Sadece larval evrede gerçekleşen beslenme aktivitesinde ipek böcekleri yalnızca taze dut yaprakları ile beslenirler (Acorn et al., 2003). Sindirim kanalı, gastrulasyon ve yeni germ tabakalarının oluşmasından sonra şekillenmeye başlar.

Embriyonun ön ve arka uçlarındaki hücreler, ön bağırsak, arka bağırsak ve orta bağırsağı oluşturmak üzere içeriye doğru göç ederler ve oluşan bu çöküntüler sonucu ön ve arka bağırsak ektoderm, orta bağırsak endoderm orjinli olarak gelişir. Bağırsak tarafından sarılı olan yolk içerisinde bulunan vitellofajlar, orta bağırsak epitelini oluşturmak için endoderm ile bütünleştirilir (Klowden 2007).

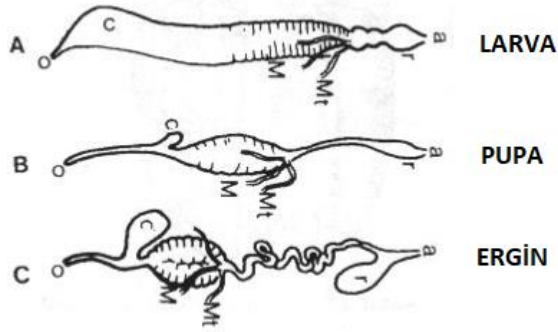
Bu işlemler sonrasında sindirim sisteminde görev alacak 3 ana bölge oluşur; bunlar ön, orta ve arka bağırsaktır (Şekil 1. 1). Ön bağırsak besinlerin alınması, öğütülmesi, depolanmasını ve bir sonraki bölüme aktarılmasını sağlar. Orta bağırsak sindirim enzimlerinin üretilmesini, salgılanmasını; besinlerin sindirimini ve emilimini gerçekleştirir. Arka bağırsakta ise suyun, tuzların ve diğer yararlı maddelerin geri emilimi gerçekleşir (Gullan, et.al, 2010).



Şekil 1. 1 Böceklerde sindirim kanalının 3 bölgeye ayrılmış görünümü. Ön ve arka bağırsakta bulunan kutikula koyu siyah renk ile gösterilmiştir (Gullan et al., 2010).

Bağırsağın etrafı lümeninin kasılarak genişlemesini ve besinlerin sindirim borusu içerisinde ilerlemesini sağlayan ekstrinsik visseral kaslarla çevrilidir (Klowden 2007). Epitel doku ile kas doku arasında ise bağlayıcılık görevi yapan bağ doku bulunmaktadır. Özellikle holometabol böceklerin her bir yaşam evresinde sindirim kanalı yeniden şekillenerek larval, pupal ve ergin evrelerde beslenmeyle ilgili değişikliklere uygun hale gelir (Malta et al., 2017). Beslenmenin aktif olarak gerçekleştiği larval dönemde uzun olan sindirim kanalı

pupal evrede kısalmaya başlar. Ergin ipek böceklerinde beslenme olmadığı için, sindirim kanalı fonksiyonunu yitirmiştir ve larval döneme göre önemli oranda gerilemiştir (Şekil 1.2).



Şekil 1. 2 İpek böceğinde gelişim evreleri süresince sindirim sistemindeki değişiklikler. (r:rektum, a:anüs, o:özofagus, c:mide, m:mezenter, mt:malpighi tüpleri (Parlak, 2001).

Böcekler, ergin evreye gelene kadar özellikle çevreden besin alımı olmadığına var olan kaynaklarını yönetebilmeli ve geri dönüşümü sağlayabilmelidir. Holometabol böcekler için orta bağırsağın yeniden şekillenmesi, sindirim sisteminin larvalarla erginler arasında önemli farklılık gösterebilen farklı beslenme alışkanlıklarına uyum sağlayabilmesi için çok önemlidir. Bundan dolayı metamorfoz sırasında, holometabol böceklerde özellikle orta bağırsak belirgin olarak yeniden yapılır. İpek böceklerinde larval-pupal metamorfoz sürecinde larval orta bağırsaktan pupal orta bağırsağın oluşumu gerçekleşir. Larval epitelde yer alan ve olgun hücreler olan silindirik epitel (enterositler) ve goblet hücreleri ile az sayıdaki endokrin hücre PHÖ yoluyla dejenere olurken; epitelin bazal bölgesinde yer alan az sayıdaki kök hücre çoğalıp, farklılaşır (Malta et al., 2017).

Orta bağırsakta 4 tip hücre bulunmaktadır; bunlar tek katlı silindirik epitel hücreleri, goblet hücreleri, endokrin hücreleri ve rejeneratif (kök) hücrelerdir. Bu hücrelerin tamamı endodermal hücrelerden oluşur. Ön ve arka bağırsakta bulunan ve emilimi büyük ölçüde engelleyen kitin tabakası orta bağırsakta bulunmamaktadır. Orta bağırsak lümeni, epiteli mekanik hasarlardan, bakteri ve parazit enfeksiyonlarından koruyan, toksinlere ve zararlı insektisitlere karşı bir bariyer oluşturan ve besinlerin seçici geçişinde rol oynayan bir peritrofik membran ile kaplıdır (Terra, 2001; Casati, 2014). Silindirik epitel hücrelerinden

oluşan epitel tabaka, bağırsak yüzey alanını genişletmek için villuslar meydana getirmiştir. Yine epitel hücrelerinin apikal yüzeylerinde bulunan mikrovilluslar da emilim yüzeyinin arttırılmasında önemlidir. Goblet hücreleri orta bağırsak lümeni ile etkileşim halinde bulunur ve lümeneye bakan yüzeyinde hücre membranının katlanmalarından oluşan mikrovilluslarla kaplanmış büyük bir intrasellüler boşluğa sahiptir (Nation, 2002). Bu hücreler hemolenften lümen içerisine potasyum iyonu taşımaktadırlar. İyonların bu hareketi, emilecek besinlerin gereksinim duyduğu bağırsaktaki su akışı için önemlidir. Orta bağırsak epitelinin bazal bölgelerinde az miktarda endokrin hücreleri de bulunmaktadır. Bu hücreler kök hücrelerin farklılaşmasında, ayrıca sindirim enzimlerinin sentezlenmesi ve salgılanmasını düzenlemede rol oynarlar (Wigglesworth, 1972; Casati 2014).

Larval orta bağırsakta yer alan olgun hücrelerin ömürleri çok kısıtlıdır, bundan dolayı epitelin hemolenfe bakan kısmında, bazal bölgede yerleşmiş sayıca az olan rejeneratif kök hücreler sürekli olarak çoğalıp farklılaşarak larval epitelin devamlılığını sağlar (Smagghe et al., 2005). Larval-pupal metamorfoz sürecinde ise pupal epiteli oluşturarak; pupal orta bağırsağın şekillenmesini sağlarlar. Bu süreçte larval orta bağırsağa ait olan olgun hücreler ise otofaji ve apoptozun birlikte gerçekleşmesi sonucu dejenerasyona uğrayarak lümeneye itilir ve “sarı cisimcik” adını alır.

1.3 Orta Bağırsağın Yeniden Şekillenme Sürecinde Hormonal Regülasyon

Holometabol böceklerde metamorfoz esnasında larval dokuların yeniden şekillenmesi ya da tamamen ortadan kaldırılmasında bu sürecin en önemli düzenleyicisi hormonlardır (Wigglesworth, 1972; Smagghe et al., 2005).

Özellikle 20-hidroksiiekdizon (20E) böcek metamorfozunun en önemli düzenleyicisidir ve bu süreçte böcek hücrelerinde gerçekleşen hücre ölümü, yeniden şekillenme ya da kök hücrelerden yeni dokuların oluşum süreçlerini aktive edebilir (Tian et al. 2014). Metamorfoz sırasında larval dokular PHÖ ile dejenerasyona uğrarken, kök hücreler ise çoğalıp farklılaşarak pupa ya da erginde iş görecektir dokuları şekillendirmektedir.

Sakurai ve ekibi (1997) *Bombyx mori*'de yaptıkları çalışmada hemolenfteki ekdizon düzeylerini son larval evrenin ilk 3 günü çok düşük seviyede belirlemiş ancak 3. günde küçük bir ekdizon pikinin meydana geldiğini göstermişlerdir. 4. günden itibaren artmaya başlayan 20E düzeyleri 7. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Pupalasma gerçekleşene kadar aynı seviyede devam eden ekdizon seviyeleri deri değişimi öncesi daha fazla artış göstererek 2. en yüksek seviyesine ulaşmış ve pupal deri değişimini başlatmıştır (Sakurai et al., 1997).

20E lepidopterde kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan en temel uyaran olduğu farklı türlerde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca lepidoptera'daki temel hemolenf proteini arylphorin'den üretilen α -arylphorin ve insülin benzeri peptid olan bombyxin'in de kök hücreler üzerinde etkili hormonlar olduğu ve mitoz bölünmeyi uyardıkları belirlenmiştir (Smaghe et al., 2005). *Manduca sexta*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera littoralis*, ve *Leptinotarsa decemlineata*'da yapılan çalışmalarda da α -arylphorin larval orta bağırsak kök hücrelerinin çoğalmalarını sağladığı gösterilmiştir (Hakim et al., 2010).

Böceklerde bulunan ikinci temel hormon, juvenil hormon (JH)'dur (Goncu et al., 2012). Juvenil hormonun ekdizona antagonist etki göstererek tetiklediği metamorfik süreçleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Goncu et al., 2016). JH'un programlanmış hücre ölümünde ve kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşma süreçlerindeki moleküler mekanizmaları hala tam olarak anlayamamıştır. Fakat, Goncu ve ekibi (2012;2016) yaptıkları çalışmalarda juvenil hormonun ekdizon ile ilgili bazı genlerin ekspresyonunu engellediğini ve metamorfoz sırasında ekdizonun etkilerini kısıtladığı kanıtlanmıştır. *Bombyx mori*'de juvenil hormon analogu fenoksikarbın son larval evrenin ilk günü yaptıkları 1ng uygulaması sonucunda ekdizon salınımının geciktiği bununla beraber larval evrenin 4 gün uzadığı ve orta bağırsağın yeniden şekillenme sürecinin geciktiği belirlenmiştir.

1.4 Kök Hücrelerden Pupal Orta Bağırsağın Oluşumu

Kök hücreler genellikle büyüme ve onarım için kullanılan hücrelerin bir rezervuarı olarak iş görürler (Hakim et al., 2001). Orta bağırsak kök hücreleri genellikle *Lepidoptera* türlerinde hücresel ve fizyolojik düzeyde yoğun şekilde çalışılmıştır. Böcek orta bağırsak epitelinin gelişimsel biyolojisi, tüm olgun

bağırsak epitel hücrelerinin bağırsak kök hücrelerinden üretildiği memelilere benzemektedir (Watt and Hogan, 2000; Loeb et al., 2003).

Orta bağırsak epitel hücrelerinin yenilenme kabiliyeti 1886'dan beri bilinmektedir ve *Collembola*, *Isoptera*, *Blattodea*, *Orthoptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera* dahil olmak üzere çeşitli türlerde tanımlanmıştır (Corley and Lavine 2006). Epitelde yer alan olgun hücreler her bir deri değişimi sırasında tamamen ya da kısmen yenilenir. Bütün böcek türlerindeki orta bağırsakta bulunan epitelial kök hücreleri, her deri değişiminden hemen önce çoğalır ve değişimden sonra farklılaşarak olgun epitel hücrelerine dönüşürler.

Choristoneura fumiferana, *Lymantria dispar*, *Bombyx mori*, *Manduca sexta* ve *Heliothis virescens* gibi lepidopter türlerinin larval-pupal metamorfoz döneminde orta bağırsak epitelinin altında bulunan kök hücrelerinin çoğalıp farklılaştıkları belirlenmiştir. Hücrelerin farklılaşma süreci hemolenfte bulunan faktörler, dejenerasyona uğrayan larval epitelden salınan moleküller ve hücrenin nişi tarafından kontrol edilir (Loeb et al. 2003).

Orta bağırsak kök hücre nişi, hem farklılaşmış silindirik epitel hem de goblet hücrelerinin yanı sıra hemolenften gelen hormonal ve diğer sinyalleşme moleküllerinden oluşmaktadır. Kültür ortamındaki orta bağırsak epiteli hücrelerine, ekdizonun aktif formu olan 20E verildiğinde hücrelerde çoğalma farklılaşma ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Corley and Lavine 2006).

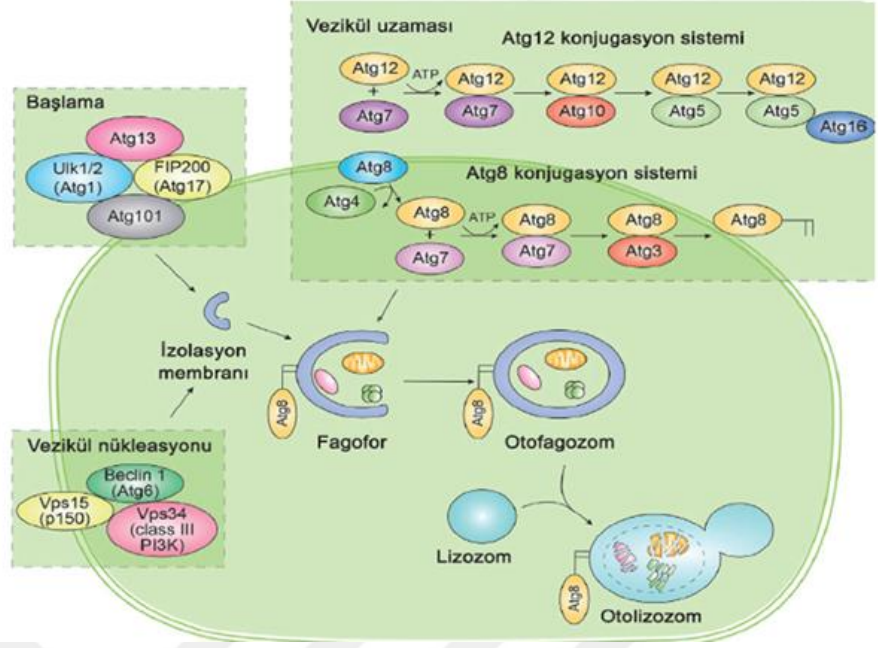
İpek böceğinde beslenme aktivitesinin kesildiği ve örme aktivitesinin başladığı pupa öncesi (prepupal) dönemde larval epitelin altında sayıca az bulunan kök hücreler öncelikle hızla büyüyüp çoğalmaya başlar. Böcek koza içinde hareketsiz ve henüz deri değişimi gerçekleşmemişken (farat pupa) çoğalan bu kök hücreler, atılacak olan larval epitelin altında, ilk olarak çok katlı kübik epitel formunda organize olurlar. Pupalışmanın gerçekleşmesi ile birlikte hücreler silindirik epitel morfolojisi kazanmaya başlar ve lümen etrafında tek katlı silindirik epiteli oluştururlar (Hakim et al., 2010). Pupal evrenin 24. saatinde pupal orta bağırsağın oluşumu tamamlanır.

1.5 Kök Hücrelerde Otofaji

Otofaji hücre içinde biriken, fonksiyonunu yitirmiş, yaşlanmış organel ya da hücre içi makro moleküllerin ortadan kaldırılmasını ve yıkıma uğrayan maddelerden yapı taşlarının geri kazanılmasını sağlayan önemli bir hücre mekanizmasıdır. Otofajinin en büyük uyarıcı besin açlığıdır. Bunun yanı sıra büyüme faktörü yokluğu, hipertermi, hipoksi, yaşlanma gibi durumlarda da görülmektedir. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak stres koşullarında hücrenin ortama uyumuna yardım ettiği ve hücre homeostazisinin korunmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra yakın zamanda yapılan çalışmalarda otofajinin morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanması ve ölümü olaylarında da etkili olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda hücre içi patojenlerin yıkımında da rol oynamaktadır (Gözüaçık 2011).

Otofaji üç farklı mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılıklı otofajidir. Bu çalışmada otofaji ile kastedilen makrotofajidir.

Otofaji mekanizmasında rol oynayan proteinler ilk kez maya da yapılan çalışmalarda bulunmuştur. Bu proteinler “otofaji ile bağlantılı proteinler”(Autophagy-related proteins) – “Atg proteinleri” olarak tanımlanmıştır (Gözüaçık 2011). Bir kısmı izolasyon membranı ve otofagozom oluşumunda rol oynayan 30’den fazla Atg geni tanımlanmıştır (Phadwal et al. 2013). İlk kez maya’ da mantar oluşumuna karşı kullanılmak üzere geliştirilen rapamisin denilen ilacın hedefi olan TOR proteini (target of rapamisin), hücrede protein sentezini ve hücrenin büyümesini kontrol eden bir kinazdır. Mayalarda ve memelilerde TOR proteininin otofajinin önemli bir düzenleyicisi olduğu ve baskılanması durumunda otofajinin aktifleştiği bildirilmiştir (Jung et al. 2010). TOR proteini hücrenin besinsel statüsü ile otofajik aktivitenin gerçekleşmesinde anahtar bir proteindir.



Şekil 1. 3 Otofaji mekanizması (Karadağ 2016).

Hücrede besin varlığında, TOR aktifleşerek otofajiyi uyararak ATG1, ATG13, ATG17 kompleksinden ATG13'ü fosforilleyerek kompleksin bozulmasına neden olur ve bu sayede otofaji inhibe edilir. Besin açlığında ise TOR engellenir, otofajiyi uyararak kompleks bozulmaz ve otofaji aktive edilir. Sonraki basamak izolasyon membranının çekirdeklenmesi (vezikül nükleasyonu) genellikle endoplazmik retikulumda ya da golgi, plazma membranı kaynaklı oluşmaktadır. Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K kompleks 3) kompleksi membran oluşumunu başlatır. Vezikül membranının uzaması ve kesecik halini alması; iki übikuitin benzeri konjugasyon sistemi tarafından kontrol edilmektedir (Şekil 1.3) (Geng and Klionsky 2008). Bunlar; ATG12-ATG5-ATG16 ve ATG8 (memelilerde LC3- Mikrotübül bağlantılı protein 1A/1B hafif zincir-3) - PE (Fosfatidiletanolamin) komplekslerinden oluşmaktadır. 1. sistem ATG12-ATG5-ATG16 kompleksi; ATG12 ve ATG5, E1 benzeri enzim (ubiquitin aktive edici enzim) ATG7 ve E2 benzeri enzim ATG10 yardımıyla kovalent olarak bağlanmaktadır. ATG16'da bu komplekse bağlanır ve bu oluşan kompleks vezikül membranına bağlanarak vezikül uzamasını sağlamaktadır. 2. sistem ATG8- PE kompleksinin oluşumu; ATG8/LC3-I'in N-terminal karboksil ucundaki 5 amino asidin ATG4 proteazı tarafından kesilmesi ile açığa çıkan glisin amino asidine fosfatidiletanolamin (PE)'nin kovalent olarak bağlanması sonucu gerçekleşir. ATG8/LC3-II – PE

kompleksi vezikül membranına bağlanarak zarın uzamasını sağlar ve zar uzayarak sindirilecek olan yapıları çevreleyerek otofagozomu oluşturur. Otofagozom oluşumu tamamlandıktan sonra ATG12-ATG5-ATG16 kompleksi vezikülden ayrılmaktadır (Maiuri et al. 2007). Son olarak otofagozomlar lizozomlarla birleşir. Lizozom pH'ı normalde 5.0 iken otofajik aktivite arttığında pH düşer, otofagozomun iç zarı ve içeriği lizozomal hidrolazlar ve proteazlar ile parçalanır. Bu enzimlerden özellikle asit fosfataz, asit ribonükleaz ve katepsinler önemli rol oynamaktadır (Castro-obregon., 2010)

1960'larda, Lockshin ve Williams ipek böceğinde intersegmental kasların metamorfik dejenerasyonunu incelerken "otofajik hücre ölümü" terimini kullanmış ve tip 2 hücre ölümü olarak sınıflandırmaya dahil etmiştir (Lockshin and Williams, 1965; Romanelli et al., 2016). O zamandan beri, Lepidoptera'da, ipek bezleri, yağ doku ve orta bağırsak gibi metamorfoz sırasında tamamen dejenere olan ya da kısmi olarak yeniden şekillenen diğer birçok larval organda otofajik özellikler gösterilmiştir. Otofaji ipek böceğinde ilk olarak ölmekte olan hücrelerde yapılan çalışmalarda belirlenmiş, son birkaç yılda ise otofajik süreci yöneten ve gerçekleştiren genlerin çoğu ipek böceği genomunda tanımlanmıştır (Romanelli et al. 2016). Bunlar, otofaji ile bağlantılı (ATG) genleri ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyal yolağına ait proteinleri kodlayan genleri içerir (Badadani 2012).

Otofajinin hücre ölümünde oynadığı rolün gerek omurgalı gerekse böcekler gibi omurgasız hayvanların dokularında araştırılmasının yanı sıra; kök hücrelerin devamlılığında, çoğalmalarında ve farklılaşmalarında otofajinin rolüne ilişkin yapılan çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir.

Fare embriyonik kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada vezikül nükleasyonunu sağlayan kompleksin ana elemanlarından olan ve memelilerde Beclin-1 olarak adlandırılan proteinin eksikliğinde, farelerin erken embriyonik dönemde öldükleri görülmüştür. Üstelik fare embriyonik kök hücrelerinde hem ATG5 hem de Beclin-1'in mutasyona uğradığı durumda, embriyonik morfogenez sırasında kavitasyon oluşumunda hata gözlenmiştir. ATG5 ve Beclin1 memelilerde embriyonik morfogenez boyunca yalnızca ölü yapıların temizlenmesi

için gerekli olmayıp; aynı zamanda apoptotik hücrelerin etkin bir şekilde uzaklaştırılması için gerekli olan "ye beni" sinyallerinin başlatılması için de gereklidir (Yue et al. 2003). Ayrıca, otofaji geni Ambra1 (PI3K kompleksinin bileşeni)'in homozigot mutasyonu hücrelerde übikitinleşmiş protein birikimine yol açması ve ciddi boyutta nöral tüp oluşumunda yarattığı kusurlardan dolayı embriyonik farelerde ölüme ve embriyonik kök hücrelerin işlevlerinde eksikliklere neden olur. Tüm bu kusurlar otofajik bozukluk ve düzensizliğe bağlıdır (Phadwal et al. 2013).

Otofajinin insan embriyonik kök hücrelerinin (HES) farklılaşmasındaki rolü hakkındaki kanıtlardan biriside hücrelerin farklılaşması sırasında LC3 (Mayalardaki ATG8 homoloğu) birikiminin artışıdır. LC3 miktarlarında hiçbir artış olmadığında insan embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmasının da geç olduğu görülmüş; erken farklılaşma ve otofajinin uyarılması arasında güçlü bir bağ olduğu sonucu ortaya konmuştur (Tra et al. 2011).

Lee ve arkadaşları (2012), hipoksiyle uyarılan otofajinin mezenşimal kök hücrelerin kök hücre olma durumunu korumasını ve kendini yenilemesini sağladığını bildirmiştir (Pan et al. 2013). Diğer araştırmalarda da, yine otofajinin hematopoetik kök hücrelerin kök hücre olma durumunun korunması için gerekli olduğunu gösterilmiştir (Liu et al., 2010; Pan et al., 2013).

Son yıllarda yapılan çalışmalar otofajinin sağlıklı kök hücrelerin yanı sıra, kanser kök hücrelerinde de varlığını göstermiştir. Primer göğüs kanseri kök hücrelerinin (BCSC) çok yüksek otofajik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Birkaç BCSC hattında Beclin 1 ve Atg7'nin aktivitesinin düşürülmesinin kendi kendine yenilenmenin önemli bir şekilde bozulmasına ve tümör oluşturma potansiyelinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Tra et. al., 2011). Bir başka çalışmada ise otofajinin pankreas kanseri kök hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayabileceği öne sürülmüştür (Singh et al., 2012; Pan et al., 2013).

Otofaji farklı tipteki kök hücrelerin kendini yenilemesinin ve farklılaşmasının düzenlenmesi için kritik bir mekanizma olarak görev yapmaktadır. Hem otofaji hem de übikitin-proteazom sistemi, proteinlerin kalite

kontrolü ile hücrel homeostazın korunması için önemlidir. Bu iki sistem hücrel yaşlanmayı düzenlemek için işbirliği yapmaktadırlar (Rubinsztein, 2006). Kök hücre havuzlarının bozulması veya azalması fizyolojik ve patolojik yaşlanma için tipik belirteçlerdir. Bu nedenle bu iki protein homeostazını sağlayan yolağın, kök hücre homeostazisinin düzenlenmesinde nasıl koordine edildiğinin ve kök hücrelerdeki otofajinin yaşlılık, kanser ve dejeneratif hastalıklarla nasıl bağlantılı olduğunun belirlenmesi gerekmektedir (Vessoni et al. 2012).

1.6 Klorokuin Uygulaması ile Otofajinin İnhibisyonu

Otofaji araştırmaları, mekanizmanın nasıl çalıştığı, nasıl düzenlendiğı ve hangi sinyal yolları ile ilişkili olduğu yönünde hızla devam etmektedir. Mekanizma ile ilgili tüm soru işaretlerinin cevaplanması için önce bu mekanizmanın olmadığı durumlarda hücrelerde ne gibi değişiklikler olduğunu gözlemek araştırmacılara önemli bilgiler sağlamaktadır.

Otofaji mekanizması inhibitörleri genel olarak, otofagozomun şekillenmesini inhibe edenler ve otofagozom-lizozom birleşmesini engelleyenler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Erken evre inhibitörleri, 3-Metiladenin (3-MA), wortmannin, LY294002 ve yeni tanımlanan spautin-1 dahil olmak üzere hepsi vezikül nükleasyonunu sağlayan kompleksi hedeflemektedir. Geç aşama inhibitörleri olan bafilomisin A1, klorokuin (CQ) ve hidroksiklorokuin (HCQ) lizozom pH'ını etkili bir şekilde arttırarak otofagozom-lizozom birleşmesini engellemektedir (Cicchini et al., 2015). Klorokuin, lizozomların asidifikasyonu önleyen bir ajandır ve lizozomlar gibi hücrenin asidik kısımlarının içinde birikmektedir.

Yapılan bir çalışmada nöral kök hücre hattında lizozomal inhibitörlerden, klorokuin (CQ) ve bafilomycin A1 kullanılması, zamana bağı olarak otofagozomların anormal şekilde birikmesine, p53 fosforilasyonuna, DRAM "Damage-regulated autophagy modulator" seviyelerinin artışına ve kaspaz 3 bağımlı hücre ölümüne neden olmuştur (Walls et al., 2010). Romanelli ve ekibi (2016) *Bombyx mori* larvalarına otofaji aktivitesinin başlangıcında larva başına 1mg klorokuin veya wortmannin enjekte etmişler ve (örmenin 1. günü) TEM

analizi bulgularına göre klorokuin uygulandıktan sonra orta bağırsak hücrelerinde birçok otofajik vezikülün biriktiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada amacımız ipek böceği orta bağırsağında larval-pupal metamorfoz sırasında, kök hücrelerden pupal bağırsak epitelinin oluşum sürecinde otofajinin muhtemel etkilerinin analiz edilmesidir. Bu amaçla 5. larval evrenin farklı günlerinde ve farklı dozlarda klorokuin uygulaması enjeksiyon yolu ile gerçekleştirilmiş olup; uygulama sonrası öncelikle morfolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Lizozomal enzim asit fosfataz aktivitesi hem spektrofotometrik hem de histokimyasal olarak belirlenebilmektedir. Bundan dolayı klorokuin uygulaması sonrasında otofajik aktivitede meydana gelen değişimleri belirlemek için spektrofotometrik olarak asit fosfataz aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen bulgular kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2 MATERYAL ve METOD

2.1 İpek Böceğinin Temini ve Yetiştirilmesi

İpekböceği kültür laboratuvarı $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve %70-80 nem koşullarında ipek böcekleri için optimum olacak şekilde düzenlenmiştir. Bursa Kozabirlik'ten alınan hibrid ipek böceği yumurtaları inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan yumurtalar 11 gün sonra yumurtadan çıkmıştır. Larvalar sabah, öğle ve akşam olmak üzere günde 3 kez taze dut yaprağı ile beslenmiştir (Tablo 2.1)

Tablo 2. 1 *Bombyx mori* larval yaşam periyodu

LARVAL EVRELER	BESLEME ZAMANI	DERİ DEĞİŞİMİ
1. İnstar	4 gün	1 gün
2. İnstar	3 gün	1 gün
3. İnstar	3 gün	1 gün
4. İnstar	4 gün	2 gün
5. İnstar	7 gün	-

2.2 Deneyde Kullanılan Reaktif

Otofaji inhibitörü ‘Chloroquine diphosphate salt’ (Sigma, C6628) ürün koduyla temin edilmiştir.

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

Molekül ağırlığı: 515.9

Reaktif uygulaması: Reaktif 2 farklı dozda enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Her hayvana tek bir uygulama dozu gerçekleştirilmiştir (Bkz. Tablo 2.2). Uygulama zamanları, Goncu et. al., (2016)’da belirtilen otofaji ile bağlantılı genler olan ATG8 ve ATG12’nin kök hücrelerdeki ekspresyon profillerine göre belirlenmiştir.

Tablo 2. 2 Deney grupları, kullanılan hayvan sayıları ve uygulanan reaktif dozları

Grup	Kontrol Grubu	7. Gün Uygulama Yapılan Grup		8. Gün Uygulama Yapılan Grup	
Reaktif Dozu	Uygulama yok	1mg	3mg	1mg	3mg
Histolojik Analiz	5 Hayvan	5 Hayvan	5 Hayvan	5 Hayvan	5 Hayvan
Enzim Aktivite Tayini	30 Hayvan	30 Hayvan	30 Hayvan	30 Hayvan	30 Hayvan

2.3 Orta Bağırsağın Elde Edilmesi

5. larval evrenin 7. gününden itibaren hem uygulama hem de kontrol gruplarından histolojik çalışmalar için 5 hayvan, asit fosfataz enzim aktivitesi tayini için 30 hayvan dissekte edilerek orta bağırsak çıkarılmıştır. Histolojik çalışma için dokular bouin fiksatifine, enzim çalışması için alınan dokular ependorf içine alınarak analiz gerçekleştirilene kadar -80 °C’de saklanmıştır.

5. larval evrenin 7, 8 ve 9. günlerinde larval orta bağırsak alınarak LPS (lepidopter fizyolojik suyu) içinde yıkanmış ve dokular küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra orta bağırsaktan kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

5. instarın 10. günü, pupalaşmanın 0. Saati (P0) ve pupalaşmanın 24. Saati (P24) dejenere olan larval orta bağırsak lümene atılır ve pupal orta bağırsağın oluşum süreci devam eder. Lümene itilen larval orta bağırsağın uzaklaştırılması için 5. larval evrenin 10. gününden itibaren alınan orta bağırsağın lümeni LPS ile yıkanmıştır. Kalan doku pupal orta bağırsak olarak kullanılmıştır.

LPS (Lepidopter fizyolojik suyu) : 5.20 g NaCl, 0,16 g KCl, 0,24 g CaCl₂, 0,16 g NaHCO₃ distile su içerisinde çözündürülür ve pH'ı 6,5 e ayarlanır.

2.4 Larval Orta Bağırsaktan Kök Hücre İzolasyonu

Orta bağırsaktan kök hücre izolasyonu Hakim et al., (2009) göre gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kök hücre izolasyonu yapılacak hayvanları dissekte etmeden önce sterilizasyonu sağlamak amacıyla %70 alkol ile yüzeyleri silinmiş ve diseksiyon sırasında kullanacak LPS içine %0,001 olacak şekilde sodyum hipoklorit ilave edilmiştir. Diseksiyon sonrasında doku etrafındaki trake ve yağ doku uzaklaştırılmıştır. Alınan orta bağırsaklar 50 mm çapındaki petriye koyulup üzerine LPS ilave edilmiş ve burada orta bağırsak küçük parçalara ayrılmıştır. Orta bağırsak parçaları LPS ile dolu 35mm çapında petri kaplarına konulup, 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Süre sonunda bu işlem bir kez daha tekrar edilmiş ve 5 dk bekletilmiştir. 3 tekrarlı yapılan bu işlem sırasında kas veya fagositik hücreleri orta bağırsaktan uzaklaşır; işlem sonunda petri de kök hücreler ve olgun hücreler içeren orta bağırsak dokuları kalır.

Sonraki basamakta orta bağırsak doku parçaları 70 µm çapındaki basket filtre içerisine alınmış ve 50 mm'lik petri kabına yerleştirilmiştir. Petri kabının yarısına kadar LPS ilave edilmiştir. Çalkalayıcı üzerinde 90 dakika boyunca en düşük hızda inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda kök hücreler orta bağırsaktan ayrılarak petri içerisinde toplanmış; filtre üzerinde kalan kısım ise olgun hücreleri içeren larval orta bağırsak olarak değerlendirilmiştir. Petride LPS içinde kalan kök hücreler falcon tüplerine alınmış ve 400g de 10 dakika santrifüjlenerek kök hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Her iki hücre fraksiyonu da enzim aktivite analizleri için ayrı tüplere alınmış ve enzim analizi gerçekleştirilinceye kadar -80 derin dondurucuda saklanmıştır.

2.5 Histolojik Uygulamalar

Kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen dokular Bouin fiksatifinde 24 saat boyunca +4 °C'de fikse edilmiştir. Daha sonra %70 alkol içine alınan örneklerde belli aralıklarla, bouin fiksatifinin sarı rengi gidene kadar, alkol değişimi yapılmıştır. Dehidrasyon basamaklarını takiben orta bağırsak dokuları

parafin bloklarına gömülmüştür. Bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alınmış ve Hematoksilen&Eosin boyama yöntemi uygulanmıştır. Histolojik yapıların analizi ve fotoğraflarının çekimi Zeis Axioscope marka ışık mikroskopunda gerçekleştirilmiştir.

2.5.1 Hematoksilen&Eosin boyama yöntemi

Gills Hematoksilen : 6 gr hematoksilen, 42 gr alüminyum sülfat, 1.4 gr sitrik asit, 0,6 gr sodyum iodat ve 296 ml etilen glikol karıştırılır. Önce hematoksilen etilen glikolde çözündürülür daha sonra 680 ml distile su ilave edilir. Tüm malzemeler katılır ve çözündürülür.

Eosin : 1 gr eosin, 100 ml %70 alkol, 5 ml glasiyal asetik asit

Boyama Basamakları

1. Deparafinizasyon (xylol I-II).....2×10 dk
2. Hidrasyon (azalan alkol serileri).....10'ar dk
3. Yıkama (saf su)
4. Boyama-I (hematoksilen).....10 dk
5. Yıkama (çeşme suyu – saf su)
6. Boyama-II (eosin).....4dk
7. Yıkama (çeşme suyu – saf su)
8. Dehidrasyon (artan alkol serileri).....5'er dk
9. Şeffaflaştırma (xylol I-II).....2×10 dk
10. Kapatma (entellan)

2.6 Biyokimyasal Yöntemler

2.6.1 Asit fosfataz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Dokulardaki asit fosfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi substrat olarak paranitrofenil fosfat kullanılarak Bergmeyer (1974) yöntemine göre yapılmıştır. Son ürün olarak oluşan paranitrofenol miktarı spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirilmiştir.

Dokuların homojenizasyonu için;

- -80 °C'deki buzdolabından çıkarılan dokular 37°C su banyosunda çözdürülmüştür.
- Çözdürülen dokular 3 tekrarlı olarak tartılarak ependorflara koyulmuştur.
- Her doku için ependorflara 1000 µl %0,9'luk NaCL çözeltisi eklenmiştir.
- Oda ısısında, homojenizasyon tüpü (Sigma-Aldrich, P7734) ile homojenize edilmiştir.
- Homojenize edilen dokular 8000 G'de 15 dk +4°C'de santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı asit fosfataz ve protein tayini için ayrı ependorflara alınmıştır

Standartların hazırlanması

P-nitrofenol: Standartlar oluşturulurken tepkimede son ürün olarak oluşur. Giderek artan konsantrasyonlar da hazırlanarak spektrofotometrede okutulmuş ve standart grafikleri oluşturulmuştur.

- 10 µl çekilir; 10 nmol
- 20 µl çekilir; 20 nmol
- 40 µl çekilir; 40 nmol
- 60 µl çekilir; 60 nmol
- 80 µl çekilir; 80 nmol
- 100 µl çekilir; 100 nmol

0,00139 gr p-nitrofenol 10 ml sitrat tamponunda çözdürülür ve her seferinde bu hazırlanan çözeltilerden yukarıdaki miktarlarda standartlar hazırlanır. Üzerleri NaOH ile 1,4 ml'ye tamamlanır.

➤ Asit fosfataz enzim aktivitesi belirlenirken;

- 100 µl sitrat tamponu
- 100 µl p-nitrofenil fosfat
- 200 µl homojenat karıştırılarak oda ısısında 30dk inkübe edilmiştir.
- Reaksiyon 1ml 0,1N NaOH ilave edilerek durdurulmuştur.
- Örnekler ve standartlar spektrofotometre küvetlerine 900 µl örnek koyularak Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometre de 415 nm'de okuma yapılmıştır.
- Standart grafiği çizilip örneklerin her birinin, asit fosfataz miktarları belirlenmiştir
- Daha sonra unit cinsinden 1 gr dokudaki asit fosfataz miktarları hesaplanmıştır.
- 1gr dokudaki protein ve asit fosfataz miktarları belirlendikten sonra 1mg proteindeki enzim miktarı hesaplanarak Unit/mg protein cinsinden spesifik enzim aktivitesi belirlenmiş ve yorumlamalar buna göre yapılmıştır.

Sitrat tamponu: 90 mM, pH 4.8; 0,789 gr sitrik asit ve 1,54 gr sodyum sitrat 100 ml'ye ultrapür su ile tamamlanarak çözdürüldü.

P- nitrofenil fosfat solüsyonu (substrat): 20 ml sitrat tamponu içerisinde 0,0027 gr p-nitrofenol fosfat çözdürüldü.

1N NaOH solüsyonu: 4gr NaOH 1 litre ultrapür su içerisinde çözdürülmüş ve reaksiyonu durdurmak için kullanılmıştır

2.6.2 Total protein tayini (Bradford yöntemi)

Total protein tayini için Bradford yöntemi (1976) kullanılmıştır.

Standart olarak 2 mg/ml stok sığır albümininden (BSA, Pierce, Thermo Scientific, Albumin Standard, Prod 23209, Lot ND170401) 30 µl'de 30 µg, 20 µg, 15 µg, 10µg ve 0 µg protein olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır.

Protein tayini için asit fosfataz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmak üzere homojenize edilmiş ve protein tayini için ayrılmış homojenatlar kullanılmıştır. 30 µl örneklerin ve standartların her birine 900 ml Bradford reaktifi (Sigma) eklenerek vortekslenmiş ve sonra örnekler polistren küvetlere koyulmuştur. Örnekler ve standartlar 595 nm'de Agilent Carry 60 UV-Vis marka spektrofotometrede okutulmuş ve standart grafikleri çizilip, örneklerin her birinin total protein miktarları hesaplanmıştır.

İstatistiksel analiz: PASW Statistics 18 programı kullanılmıştır. Örneklem sayısı 50 den az olduğu için Shapiro-Wilk normallik testi yapılmıştır, sonuçların normal dağılıma uyduğu bulunmuştur. Deney grupları ve kontrol grupları birbirinden bağımsız olduğu için Bağımsız T Testi yapılmıştır ve gruplar arasındaki değişimlerin anlamlılıkları belirlenmiştir. $p \leq 0.05$ anlamlı olan değişimler grafikteki sütunların üzerinde yıldız (★) işareti ile gösterilmiştir.

3 BULGULAR

Araştırmamızda ipek böcekleri son larval instarın 7. gününde beslenmeyi kesmesiyle beraber klorokuin uygulamaları yapılmaya başlanmıştır. Yapılan uygulamalar Tablo 2.2'de gösterilmektedir.

Kontrol grupları son larval evreyi 10 günde tamamlamış ve 11. günde pupalaşmışlardır. Pupalaştıkları günü pupanın sıfıncı saati (P0) olarak, belirlenmiştir.

Klorokuin uygulaması gerçekleştirilen böceklerin koza örme faaliyetini tamamladıkları ancak larval-pupal deri değişiminin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bu grupların gelişim evreleri belirlenirken pupalaşma olmadığı ve larval evre devam ettiği için 10. günden itibaren gelişim günleri larvanın 11. günü

(L11), larvanın 12 günü (L12) olarak yapılmıştır. Uygulama grupları hayvanlarının çoğunluğu 12. günden sonra ölmüştür.

3.1 Histolojik Bulgular

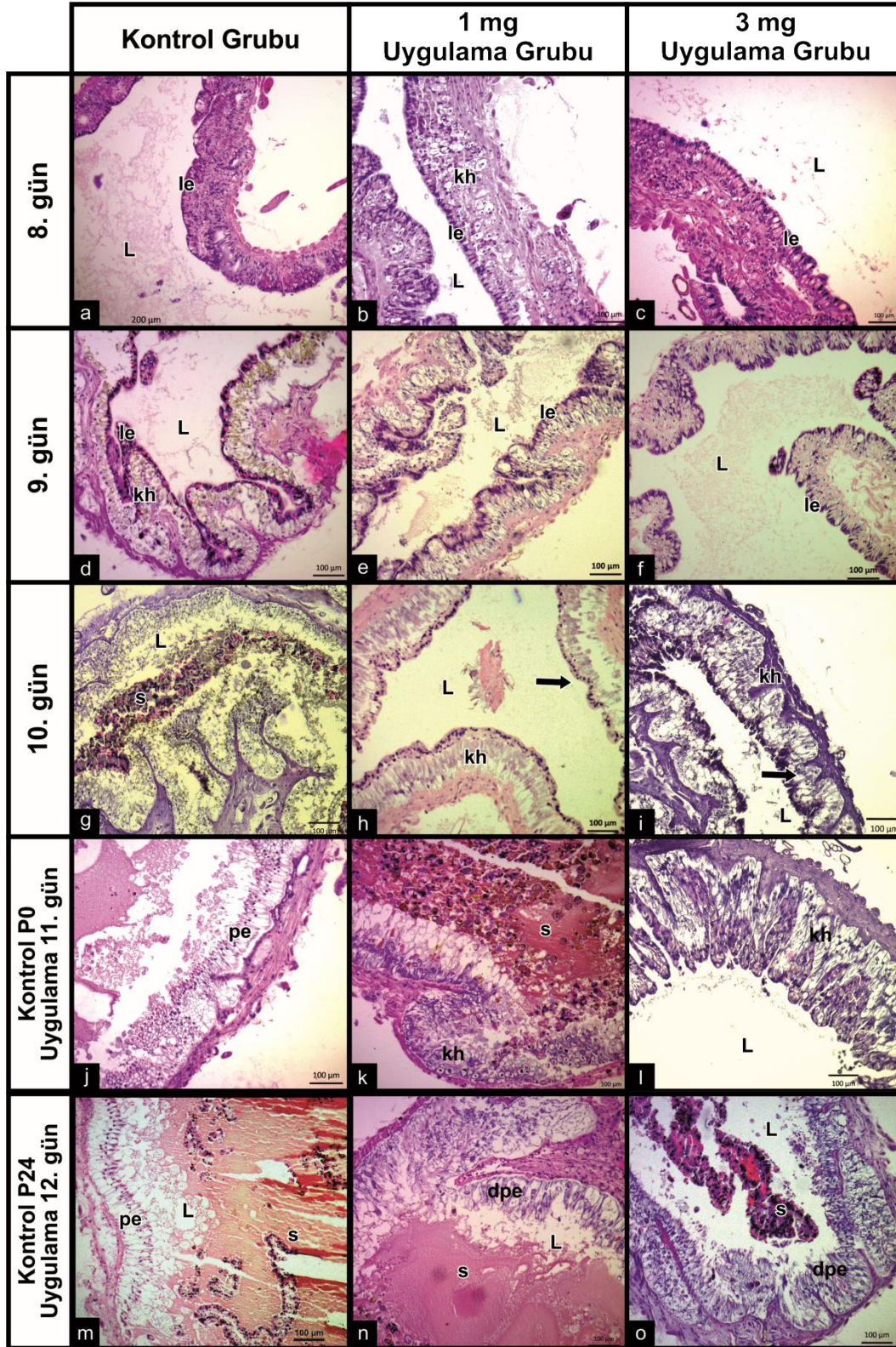
Kontrol ve uygulama grubu ipek böceklerinden elde edilen orta bağırsaklarda meydana gelen morfolojik değişimler Hematoksilen&Eosin boyama ile belirlenmiştir.

Şekil 3.1'de 5. larval evrenin 7. gününde yapılan klorokuin uygulamaları sonrasında orta bağırsakların genel görünümü yer almaktadır. Larval orta bağırsakta meydana gelen değişimler 5. instarın 7. gününde hayvanın beslenmeyi kesmesiyle beraber başlar. 5. larval evrenin 8. gününde kontrol grubunda lümeni çevreleyen tek katlı bağırsak epitel, epitel hücrelerini dıştan saran bağ dokusu ve kas tabakası görülmektedir. Bu üç tabaka birbiriyle bağlantıdadır (Bknz Şekil 3.1.a). Klorokuin uygulanan gruplardan aynı güne ait orta bağırsak kesitlerinde kontrol grubundan farklı olarak larval epitelin kapladığı alanın daraldığı görülmektedir. Bu durum hücrelerde meydana gelen büzülmenin bir belirtisi olarak değerlendirilebilir. Yine kontrol grubundan farklı olarak, epitel hücrelerinin nükleuslarının ve sitoplazmalarının yoğun boyandığı dikkat çekmektedir. (Şekil 3.1b, c). Tüm bu değişimler apoptozise spesifik morfolojik değişimler olarak görülmektedir. Kontrol grubu ile benzer olarak her iki uygulama grubunda da epitel doku, bağ doku ve kas tabakası birbiriyle yakın temastadır. Kontrol grubunda 5.larval evrenin 9. gününde olgun epitel hücrelerini içeren epitel tabaka bağırsak lümenin etrafında yerleşim göstermektedir ve dejenerasyona ilişkin görünüm belirgin hale gelmiştir (Şekil 3.1.d). Epitelin boyutunun küçülerek içeriği yoğunlaştığı ve alttaki bağ dokusu ile bağlantısının zayıfladığı görülmektedir (Şekil 3.1.d). Bu günde olgun hücreleri içeren larval epitelin altında açık renkli sitoplazmaya sahip kök hücrelerin ise özellikle hacimce büyüdüğü görülmektedir. Klorokuin uygulaması sonrasında içeriği oldukça yoğunlaşmış larval epitel her iki grupta da belirlenmiştir (Şekil 3.2., e, f). Kök hücreler, 1 mg uygulamasına ait kesitlerde, larval epitelin bazal bölgesinde açık renkli sitoplazmaları ile belirlenmiştir (Şekil 3.2.e). Ancak 3 mg uygulamasına ait kesitlerde kök hücreler ayırt edilememektedir (Şekil 3.2.f). 5. Larval evrenin 10.

gününde, kontrol grubunda larval epitel lümene itilmiş ve altındaki hücrelerden ayrılmıştır. Lümene atılan larval epitel sarı cisimciği oluşturmaktadır (Şekil 3.1.g). Bazal membranın üstünde konumlanan kök hücrelerin çoğaldıkları görülmektedir. (Şekil 3.1.g). Uygulama yapılan gruplarda en bariz farklılık olgun hücreleri içeren larval epitelin bazal membranla olan bağlantısının devam etmesi ve sarı cisimcik yapısının oluşmamış olmasıdır. Bu epitelin altındaki kök hücreler ayırt edilmektedir (Şekil 3.1. h, i). Larval-pupal deri değişiminden hemen sonra pupal evrenin 0. saatinde (P0) yer yer kübik epitel hücrelerin çok tabakalı bir yapı oluşturdukları görülmektedir. Hücrelerin altında bağ doku ve kas tabakası göze çarpılmaktadır. Lümende sarı cisimciğe ait yapılar görülmektedir (Şekil 3.1.j). 1 mg klorokuin uygulanan grupta larval epitelin lümene itildiği, sarı cisimciğin oluştuğu belirlenmiştir. Bazal membranın üzerinde kök hücreler görülmektedir (Şekil 3.1.k). 3 mg uygulaması yapılan grupta ise sarı cisimcik hala oluşmamıştır. Ancak bazal membranla arasında açık renkli kök hücreler görülmektedir (Şekil 3.1.l). Pupanın 24. saatinde (P24) orta bağırsak epitel hücreleri silindirik epitel haline dönüşmüş ve lümeni çevrelemektedir. Lümende bulunan sarı cisimcik yapılarında dejenerasyon ilerlemiştir (Şekil 3.1.m). Klorokuin uygulanan gruplarda sağlıklı pupal epitel yapısının oluşmadığı görülmektedir (Şekil 3.1.n, o).

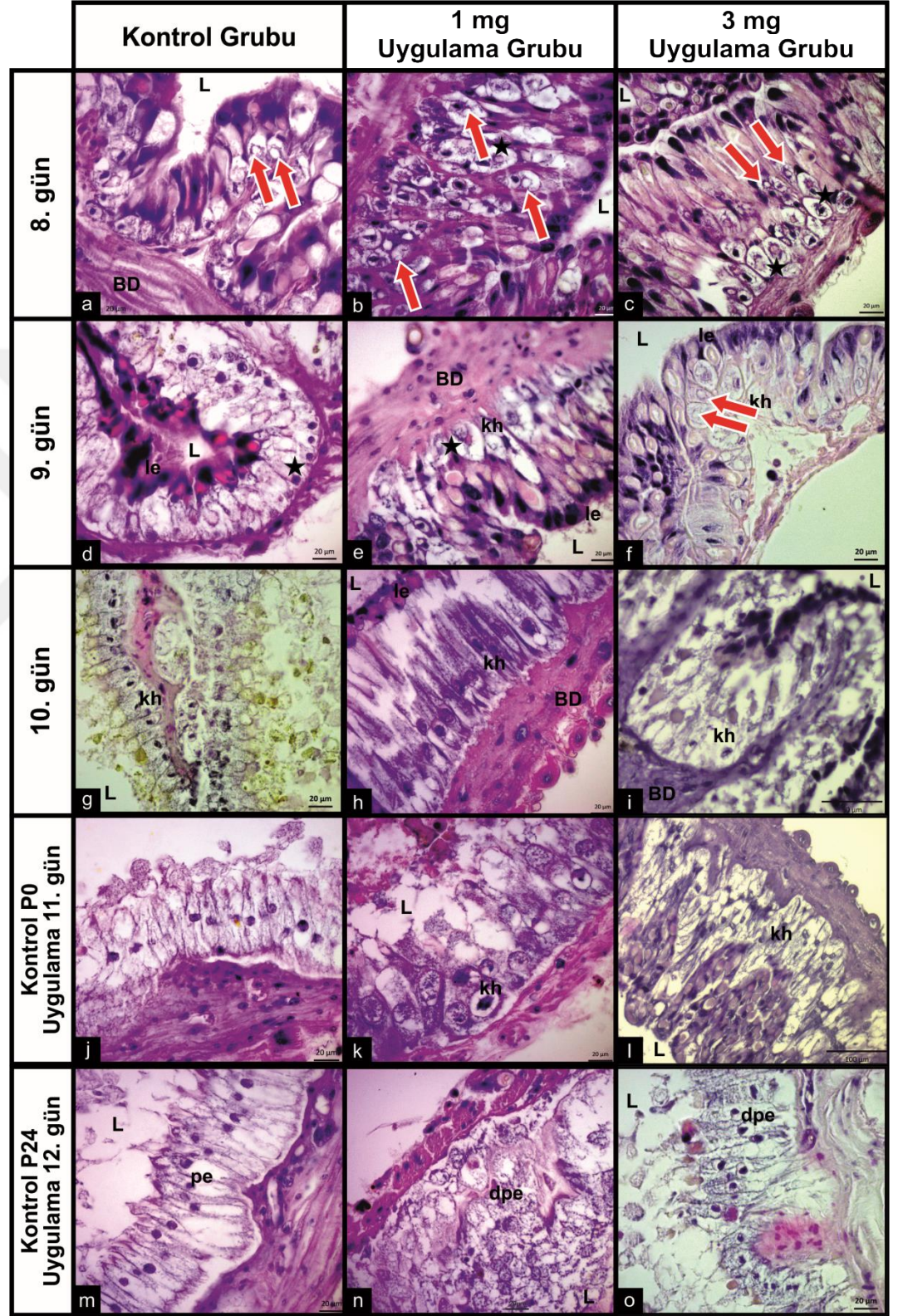
Şekil 3.2'de 5. larval evrenin 7. gününde yapılan klorokuin uygulamaları sonrasında orta bağırsakların ayrıntılı görünümü yer almaktadır. Özellikle son larval evrenin 8. gününde büyüyen kök hücrelerin içinde yuvarlak granüllü yapılar gözlenmiştir (Şekil 3.2a, b, c). Bu yapıların ne olduğuna dair Turbeck (1974) yayınında bazı Lepidopter larvalarının orta bağırsak kök hücrelerinde sferit olarak adlandırılan konsantrik tabaka şeklinde granüller olduğunu bildirmiştir. Bu yapıların kök hücrelerinin büyümesi için gerekli magnezyum ve kalsiyum fosfat gibi maddeleri depoladıkları belirlenmiştir (Turbeck 1974). 9. Günde kontrol grubunda bazal lamina ile larval epitel arasında genişleyen kök hücre tabakası görülmektedir. Larval epitel hücresel yapısının büyük oranda bozulduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2.d). Klorokuin uygulamalarına ait kesitlerde ise larval epitel ve bazal lamina arasında kök hücre tabakası ayırt edilmekle birlikte kontrol grubundaki kadar geniş olmadığı görülmektedir. Bundan dolayı larval epitel ile bazal lamina birbirlerine daha yakın konumdadır (şekil 3. 2. e, f). 10. günde kontrol grubunda larval epitelin bazal laminadan tamamen ayrılıp lümene göç

etmesi ile birlikte lümenin etrafında bulunan kök hücreler pupal epitelini oluşturmak üzere organize olur. Bu günde kübik epitel formunda belirlenen epitel hücreleri yer yer çok tabakalı bir yapı meydana getirmiştir (Şekil 3.2.g). Bu güne ait uygulama gruplarının kesitlerinde ise hücre morfolojileri oldukça farklıdır. 1 mg klorokuin uygulama grubunda larval epitel halihazırda alttaki kök hücre tabakasından tamamen ayrılmamıştır ve kök hücre morfolojileri silindirik epitele benzemekle birlikte özellikle hücrelerin apikal yüzeylerinde dejeneratif değişimler gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 3.2.h). 3 mg klorokuin uygulaması ise kök hücrelerde düzensiz hücre morfolojisine neden olmuştur. Larval epitel, kök hücre tabakası ile bağlantı halindedir. Kök hücre miktarının da daha az olduğu göze çarpmaktadır (Şekil 3.2.i). Larval-pupal deri değişiminden sonra kontrol grubu kök hücrelerinde farklılaşmanın ilerlediği ve hücrelerin silindirik epitel hücre morfolojisini kazanmaya başladıkları belirlenmiştir (Şekil 3.2.j). 1 mg klorokuin uygulamasında ise kök hücrelerin son derece düzensiz olduğu, yer yer nekrotik hücre ölümünü düşündüren şişmiş ve membran yapısı bütünlüğünü kaybetmiş hücrelerin bulunduğu göze çarpmaktadır (Şekil 3.2.k). 3 mg uygulamasında ise bu günde larval epitel hala varlığını sürdürmektedir; kök hücrelerde ise farklılaşmaya ilişkin en ufak bir belirti bulunamamıştır (Şekil 3.2.l). Pupanın 24. saatinde, kontrol grubunda pupal epitel tamamen farklılaşmıştır. Merkezi yerleşim gösteren yuvarlak nükleusa sahip, tek tabakalı silindirik epitel şeklinde organize olmuştur (Şekil 3.2.m). Uygulama gruplarında hücrelerde bir farklılaşma belirtisi yoktur. Kök hücrelerin yapısı bozulmuş ve bazal membran üzerinde çok katlı hücre yığınları şeklinde görülmektedir (Şekil 3.2.n,o).



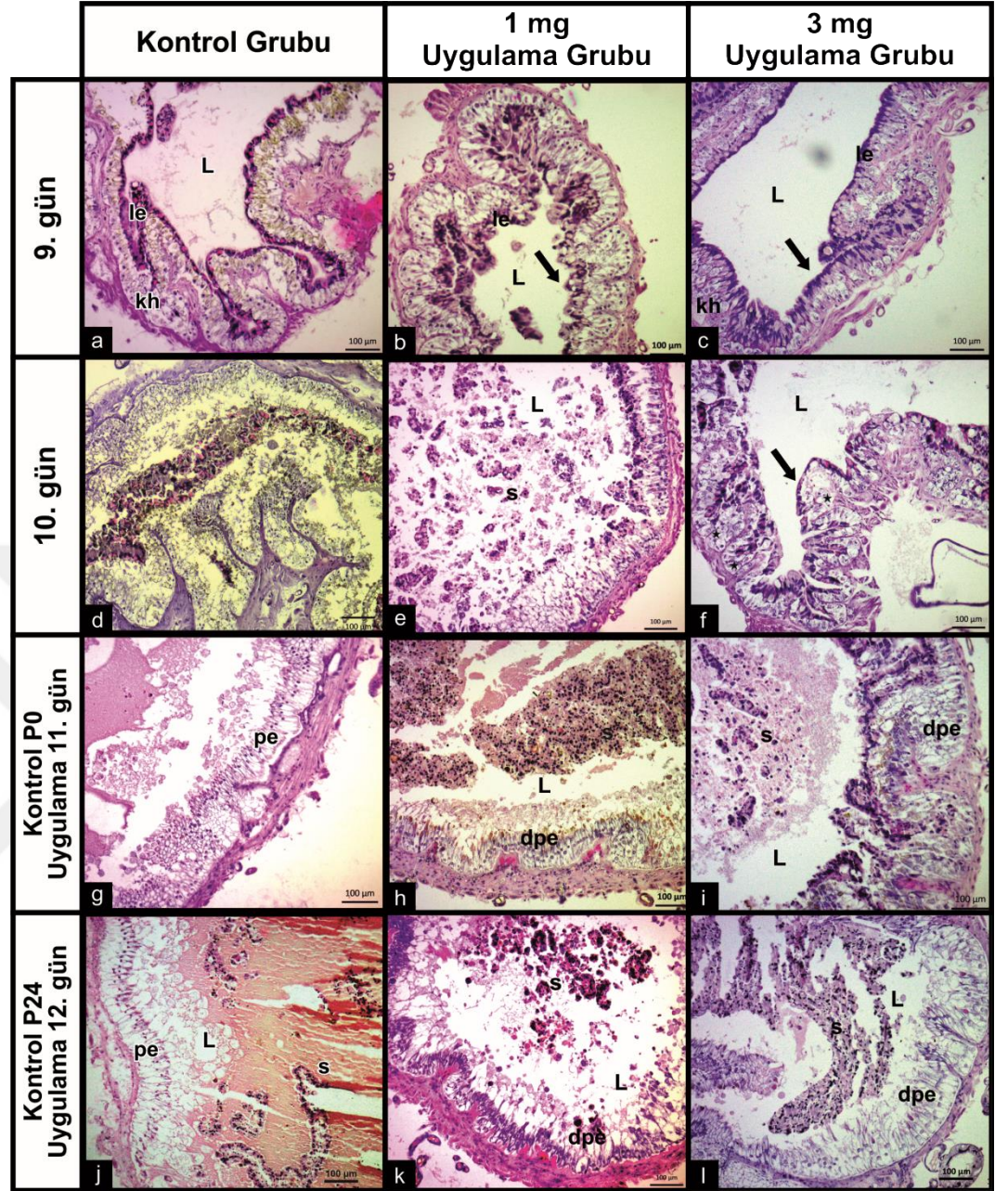
Şekil 3. 1 İpek böceği *Bombyx mori*'de larval-pupal metamorfoz boyunca kontrol grubu, 7.gün 1mg ve 3mg klorokuin uygulaması sonrasında, orta bağırsağın genel histolojik yapısı (5. İnstarın 8. günü- L8, 9.günü-L9, 10. günü-L10, pupanın 0. saati-P0, pupanın 24. saati-P24, larval evrenin 11.günü-L11, larval evrenin 12. Günü-L12 olarak isimlendirilmiştir.) L, lümen; s, sarı cisim; kh,

kök hücre; le, larval epitel; pe, pupal epitel; dpe, dejenere olan epitel hücreleri; siyah ok işareti atılmakta olan larval epiteli ifade etmektedir.



Şekil 3. 2 İpek böceği *Bombyx mori*'de larval-pupal metamorfoz boyunca kontrol grubu, 7.gün 1mg ve 3mg klorokuin uygulaması sonrasında, orta bağırsağın ayrıntılı histolojik yapısı (Yıldız işareti (★) ve 'kh' kök hücreleri, kırmızı ok işareti sferit yapıları göstermektedir.)

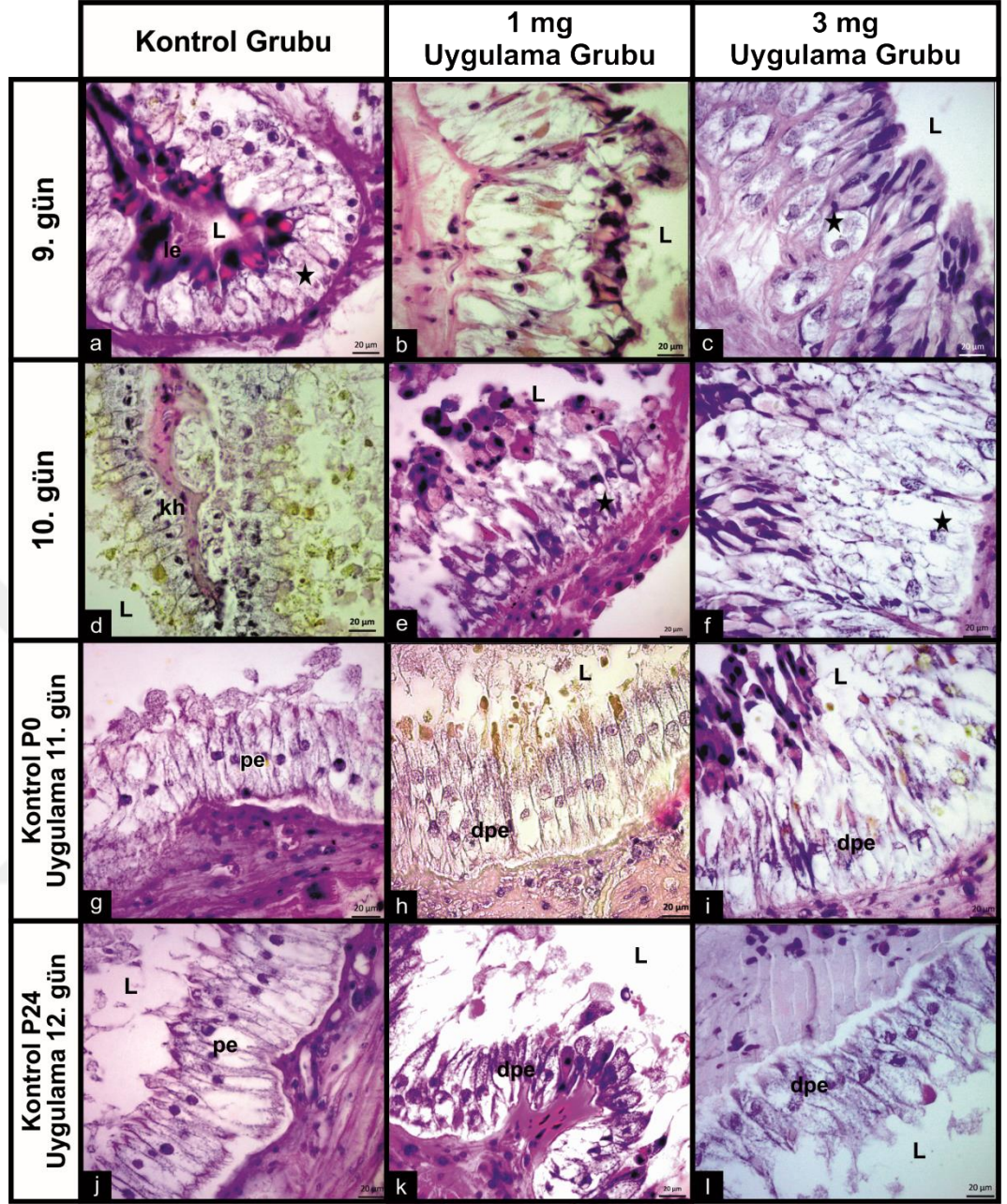
Şekil 3.3'de 5. larval evrenin 8. gününde yapılan klorokuin uygulamaları sonrasında orta bağırsakların genel görünümü yer almaktadır. Kontrol grubunda 5. larval evrenin 9. gününde larval epitelini oluşturan hücrelerin sitoplazma ve nükleuslarında yoğunlaşma ile bazal bölgede yer alan kök hücrelerin düzenli bir organizasyon meydana getirerek oluşturduğu tabaka net bir şekilde görülmektedir (Şekil 3.3.a). 1 mg klorokuin uygulamasında bu güne ait kesitlerde de benzer bir histolojik görünüm söz konusudur (Şekil 3.3.b) 3 mg uygulama grubunda ise böyle bir tabaka oluşumu ayırt edilememektedir (şekil 3.3.c). Kontrol grubunda 10. günde ise larval epitelin bazal tabakadan ayrılmasıyla lümenin etrafında bulunan ve sayıca çoğalmış kök hücreler görülmektedir (Şekil 3.3.d). 1 mg klorokuin uygulaması yapılan grupta da larval epitel lümenine itilerek sarı cisimciği oluşturmuştur. Ancak kontrol grubunda lümen etrafında görülen yoğun hücresel yapı bu uygulama grubunda gözlenmemektedir (Şekil 3.3.e). 3 mg uygulamasında ise larval epitel alttaki kök hücre tabakası ile bağlantısını korumaktadır (Şekil 3.3.f). Kontrol grubunda pupal safhanın 0. gününde çok katlı kök hücre yapılıması yer yer devam etse de belli alanlarda kübik epitel morfolojisinden silindirik epitel morfolojisine ve tek katlı yapılanmaya geçiş olduğu görülmektedir (Şekil 3.3.g). Larval-pupal deri değişiminin gerçekleşmediği klorokuin uygulama gruplarından 1mg uygulamasında lümeninde geniş bir şekilde bulunan sarı cisimcik ile lümenin etrafında seçilen kök hücreler görülmektedir (Şekil 3.3.h). 3 mg uygulama grubunda ise larval epitelin bir kısmı alttaki kök hücre tabakası ile bağlantısını korurken lümeninde de sarı cisimcik yapıları belirlenmiştir. Larval epitelin altında açık renkli boyanma paternine sahip kök hücreler belirgindir (Şekil 3.3.i). Kontrol grubunda pupal evrenin 24. saatinde pupal orta bağırsak epitelini oluşturmuştur (Şekil .3.3.j). 1 mg uygulama grubunda lümeninde sarı cisimcik, lümen etrafında ise düzensiz yapıda kök hücreler görülmektedir(Şekil 3.3.k). 3 mg uygulama grubunda ise sarı cisimciğin oluşumu büyük ölçüde bu günde gerçekleşmiştir ve lümen etrafında kök hücreler izlenmektedir (Şekil 3.3.l).



Şekil 3. 3 İpek böceği *Bombyx mori*'de larval-pupal metamorfoz boyunca kontrol grubu, 8.gün 1mg ve 3mg uygulamasında, orta bağırsağın histolojik yapısı

Şekil 3.4'de 5. larval evrenin 8. gününde yapılan klorokuin uygulamaları sonrasında orta bağırsakların ayrıntılı görünümü yer almaktadır. 9. günde kontrol grubunda larval epitel altında bulunan kök hücre tabakasının genişlemekte olduğu görülmektedir. Bu genişleme larval epitel ile bazal membran arasındaki bağlantıyı zayıflatmaktadır. Larval epitel hücrelerinin yapısının büyük oranda bozulduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4.a). 1 mg klorokuin uygulama grubunda larval epitel ile kök hücrelerin arasında ayrılmalar gözlenmektedir. Kök hücrelerin oluşturduğu

tabakanın kontrol grubuna kıyasla çok daha düzensiz olduğu ve hücre sitoplazmalarının kontrol grubundan daha açık renkli boyandığı görülmektedir. (Şekil 3.4.b). 3 mg uygulama grubunda 9. Günde genişlemiş, oval ve larval epitelin bazal kısmında yerleşim gösteren kök hücrelerin ayırtdılmaktadır. Ancak kontrol grubunda belirlenen kök hücre tabakası bu grupta oluşmamıştır. Larval epitelin bazal lamina ile olan bağlantısı devam etmektedir ve kontrol grubuna oranla hücrelerdeki dejenerasyon ilerlememiştir (Şekil 3.4.c). 10. günde kontrol grubunda larval epitelin bazal membrandan tamamen ayrılıp lümeneye göç etmesi ile birlikte lümenin etrafında bulunan kök hücreler pupal epiteli oluşturmak üzere organize olur. Genellikle kübik epitel formunda gözlenen epitel hücreleri yer yer çok tabakalı yapı meydana getirmektedir (Şekil 3.4.d). Bu güne ait uygulama gruplarında hücre morfolojilerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında büyük farklılıklar vardır. 1 mg klorokuin uygulama grubunda larval epitelin kök hücrelerde olan bağlantısı kesilmiştir. Kök hücrelerin bazal lamina üzerindeki yerleşimleri düzensizdir.(Şekil 3.4.e). 3 mg klorokuin uygulamasında ise kök hücrelerin larval epitel ile olan bağlantısı devam etmektedir. Epitel hücreleri bir önceki güne kıyasla daha fazla küçülmüş yapıdadır. Kök hücrelerin sayısı artmış ve larval epitelin altında düzensiz bir kök hücre tabakası oluşmuştur. Ayrıca hücrelerde yer yer şişmeler olduğu görülmektedir (Şekil 3.4.f). Pupanın 0. saatinde kontrol grubu kök hücrelerinde farklılaşmanın ilerlediği silindirik hücre morfolojisine dönüşmeye başladıkları görülmektedir (Şekil 3.4.g). 1 mg klorokuin uygulanan grupta kök hücrelerinde silindirik epitel yapısının olduğu görülmektedir (Şekil 3.4.h).3 mg uygulamasında ise larval epitel, kök hücre tabakasından ayrılmaya başlamıştır. Ancak kök hücrelerin yapılanmasının düzensiz olduğu görülmektedir. Silindirik epitel yapısı belirlenmemiştir. (Şekil 3.4.i). Pupanın 24. saatinde kontrol grubunda pupal orta bağırsak epiteli oluşmuş; hücreler silindirik epitel şeklini almıştır (Şekil 3.4.j). 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulanan gruplarda kök hücreler de yer yer silindirik epitel görünümlü hücreler izlense de bu hücrelerin düzensiz bir şekilde yerleşim gösterdikleri, sağlıklı bir pupal orta bağırsak epitelinin oluşmadığı; bazı hücrelerde membranın apikal bölgesinde dejeneratif değişiklikler ile hücre içeriğinde yoğunlaşma belirlenmiştir(Şekil 3.4.k,l).



Şekil 3. 4 İpek böceği *Bombyx mori* larval-pupal metamorfoz boyunca kontrol grubu, 8.gün 1mg ve 3mg uygulamasında, orta bağırsağın dejenerasyonu ve yeniden şekillenmesinin ayrıntılı gösterimi

3.2 Asit Fosfat Enzim Aktivitesi Bulguları

Bu çalışmada olgun larval hücreler ve kök hücreler ayrı ayrı analiz edilmiştir. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Enzim aktiviteleri analiz edilirken gelişim periyodu morfolojik bulgulardan yola çıkılarak 2 kısma ayrılmıştır. 1. evre 5. larval evrenin 8. gününden 10. gününe kadar olan

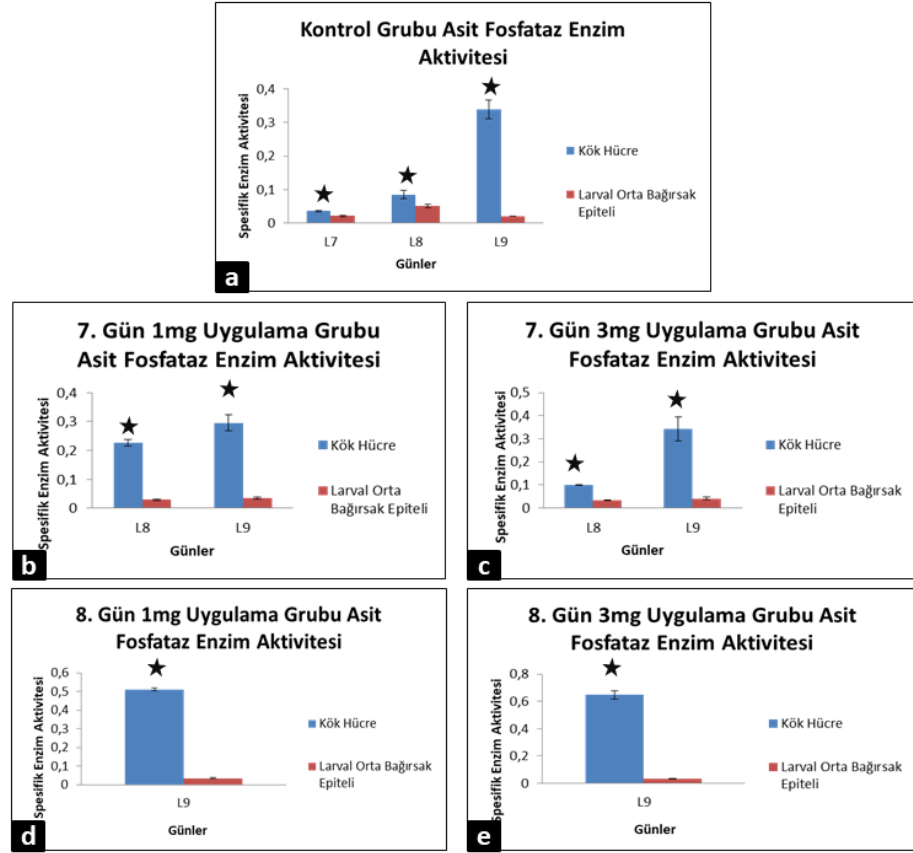
periyottur. Bu evre, larval epitel kök hücrelerinin olgun bağırsak epitel hücrelerinin bazal bölgesinde yerleşim gösterdiği ve bu hücrelerle yakın temasta bulunduğu gelişim evresidir. Bundan dolayı 1. evrede hücreler kök hücre izolasyon prosedürü ile elde edilmiş ve kök hücre olarak isimlendirilmiştir. 2. evre ise, 5. larval evrenin 10. gününden pupal evrenin 24. saatine kadar olan periyottur. Bu evre larval epitel lümenine itilerek sarı cisimciği oluşturduğu; kök hücrelerin ise pupal epitele farklılaştığı dönemdir. Bundan dolayı orta bağırsak lümeninin LPS ile yıkanması ve lümenine itilen sarı cisimciğin uzaklaştırılması sonrasında kalan pupal epitel enzim aktivite analizlerinde kullanılmıştır.

Kontrol grubunu değerlendirdiğimizde, larval epitel kök hücrelerinde 5. instarın 7. gününden, 9. güne kadar asit fosfataz enzim aktivitesi anlamlı bir şekilde artmaktadır. 9. günde enzim aktivitesi miktarı yaklaşık 7 katına ulaşmıştır. Aynı günlerdeki olgun larval epitel hücrelerindeki enzim aktivitesi ile kıyaslandığında lizozomal aktivite kök hücrelerde 7, 8, ve özellikle 9. günde anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur (Şekil 3.5.a).

7. günde yapılan 1 mg ve 3mg klorokuin uygulaması sonrasında kök hücrelerde enzim aktivitesi 8 ve 9. günlerde artarak devam etmiştir. Ayrıca kök hücrelerin enzim aktivitesi her iki günde de olgun larval epitel hücrelerinin enzim aktivitesinden yaklaşık 6 katı daha fazladır (Şekil 3.5.b,c).

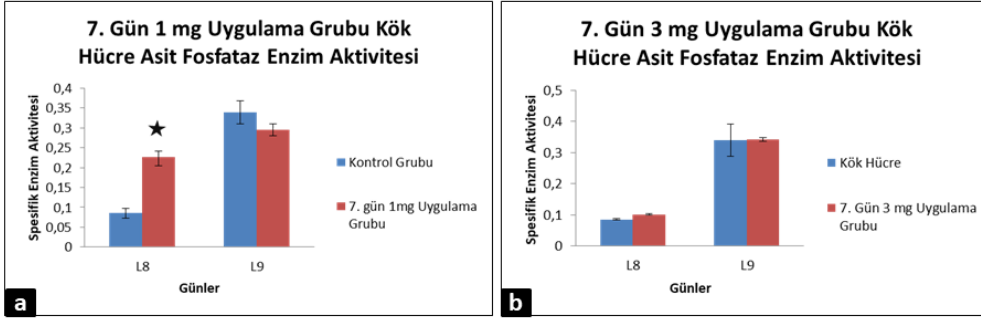
5. larval evrenin 8. günü yapılan 1mg klorokuin uygulamasında ise, kök hücrelerde 8. günde belirlenen enzim aktivitesinin olgun orta bağırsak epitel hücrelerinde belirlenen enzim aktivitesinden yaklaşık 15 kat fazla olduğu ve aradaki farkın da anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.5.d).

8. gün 3mg klorokuin uygulamasında, kök hücre enzim aktivitesi olgun larval epitel hücrelerine oranla çarpıcı bir şekilde artmış ve olgun larval epitel hücrelerinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 3.5.e).



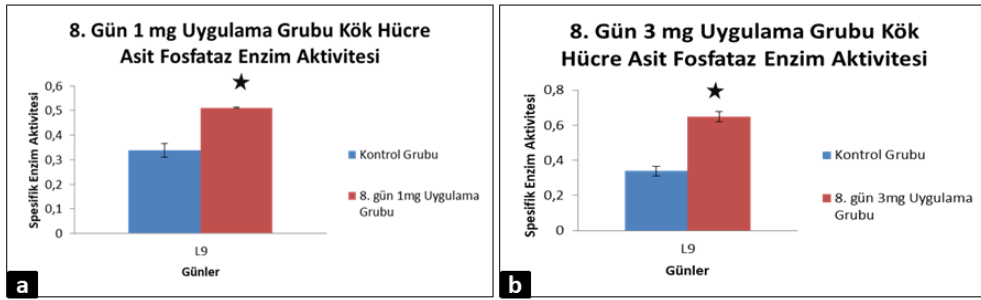
Şekil 3. 5 İpek böceği *Bombyx mori* larval-pupal metamorfoz boyunca kontrol grubu, 7.gün 1mg ve 3mg uygulamasında, 5. larval evrenin 7., 8., ve 9. günlerinde belirlenen asit fosfataz enzim aktiviteleri ($p \leq 0,05$ anlamlı olanlar yıldız işareti ile gösterilmiştir)

Uygulama gruplarından elde edilen kök hücrelerde belirlenen asit fosfataz aktiviteleri kontrol grubu ile birlikte de değerlendirilmiştir. Son larval evrenin 7. günü yapılan 1 mg klorokuin uygulama grubunda uygulamadan sonraki gün (L8) asit fosfataz aktivitesi kontrol grubundan anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. 9. günde ise kontrol grubuna benzer bir düzeydedir ve aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 3.6.a). 7. günde gerçekleştirilen 3 mg klorokuin uygulaması sonrasında ise kontrol grubu ile kıyasladığımızda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 3.6.b).



Şekil 3. 6 İpek böceği *Bombyx mori*, beşinci larval instarın 7. günü 1mg e 3 mg Klorokuin uygulaması sonucu kök hücre enzim aktiviteleri ($p \leq 0,05$)

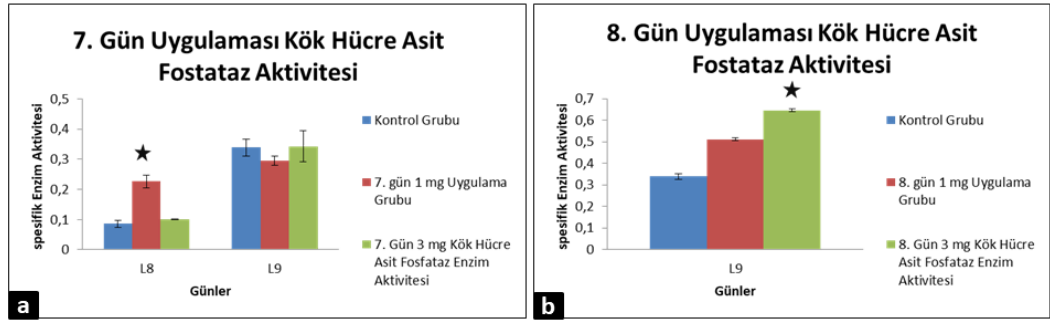
5. instarın 8.gününde yapılan 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulaması sonrasında her iki grupta da 9. günde belirlenen asit fosfataz aktivitesi kontrol grubundan anlamlı bir şekilde yüksektir (Şekil 3.7.a,b).



Şekil 3. 7 İpek böceği *Bombyx mori*, beşinci larval instarın 8. günü 1 mg ve 3 mg Klorokuin uygulaması sonucu kök hücre enzim aktiviteleri ($p \leq 0,05$)

Asit fosfataz enzim aktiviteleri her grupta kendi içlerinde de istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulmuştur. 7. günde gerçekleştirilen 2 farklı dozdaki klorokuin uygulaması sonrasında en önemli farklılık 1 mg uygulaması sonrasında 8. günde gerçekleşmiş ve hem kontrol hem de 3 mg uygulama grubundan anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur (Şekil 3.8.a).

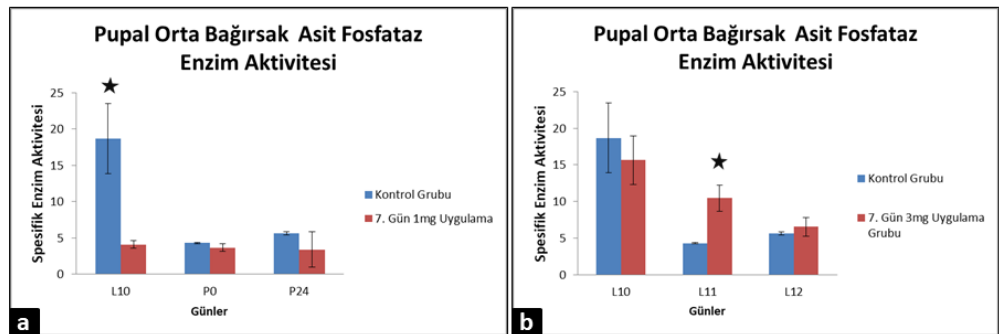
8. günde yapılan klorokuin enjeksiyonu sonrası kontrol, 1 mg ve 3 mg uygulama grupları kendi içlerinde analiz edildiğinde bu günde yapılan klorokuin uygulamasının doza bağlı olarak asit fosfataz aktivitesini yükselttiği tespit edilmiştir. 3 mg uygulanan grupta, 9. günde belirlenen enzim aktivitesi hem kontrol hem de 1 mg uygulama grubundan anlamlı ölçüde yüksektir (Şekil 3.8.b).



Şekil 3. 8 İpek böceği *Bombyx mori*, beşinci larval instarın 7. ve 8. günü 1 mg ve 3 mg Klorokuin uygulaması sonucu kök hücre enzim aktivitelerinin ($p \leq 0,05$)

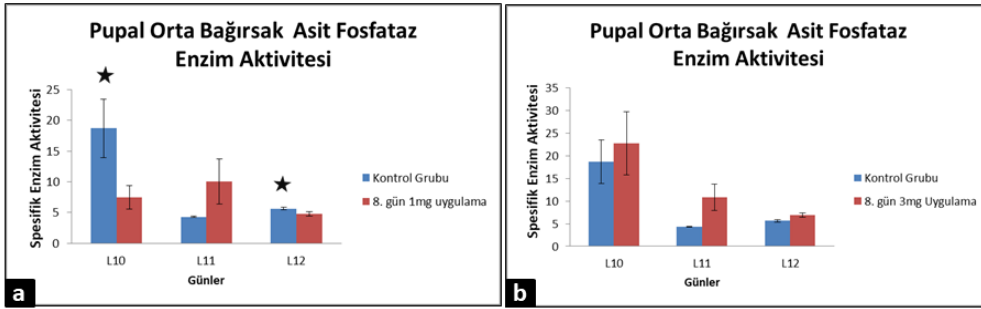
Şekil 3.9’da kontrol grubunda son larval evrenin 10. gününden pupanın 24. saatine (P24), uygulama gruplarında ise pupalaşma olmadığı için uzayan larval evrenin 12. gününe (L12) kadar enzim aktivitesi ölçülmüştür.

Son larval evrenin 7. gününde yapılan 1 mg uygulama grubunda, larvanın 10. gününde belirlenen enzim aktivitesi kontrol grubundan anlamlı ölçüde düşüktür. 11. ve 12. günlerde ise kontrol grubu ile benzer bir profil sergilemiştir (Şekil 3.9.a). 7. günde yapılan 3 mg uygulama grubunda, 10. günde enzim aktivitesinde anlamlı bir farklılık meydana gelmezken; 11. günde uygulama grubunda enzim aktivitesi kontrol grubundan yaklaşık 3 kat yüksek bulunmuştur. 5. Larval evrenin 12. gününde ise uygulama grubunda enzim aktivitesi bir önceki güne kıyasla azalmış fakat kontrol grubuyla benzer düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.9.b).



Şekil 3. 9 İpek böceği *Bombyx mori*, beşinci larval instarın 7. günü 1mg ve 3 mg Klorokuin uygulaması sonucu kök hücrelerden yeni oluşan pupal orta bağırsak hücrelerinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması ($p \leq 0,05$)

Beşinci instar 8. günde yapılan 1 mg klorokuin enjeksiyonu sonrası, 5. larval evrenin 10. gününde enzim aktivitesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azalmıştır. 11. günde ise kontrol grubuna göre miktar artış görünse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir artış değildir. Uzayan 5. larval evrenin 12. gününde enzim aktivitesi kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (Şekil 3.10.a). 8. gün 3 mg uygulaması sonrasında 10. günden 12. güne kadar belirlenen enzim aktiviteleri ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 3.10.b).



Şekil 3. 10 İpek böceği *Bombyx mori*, beşinci larval instarın 8. günü 1 mg ve 3 mg klorokuin uygulaması sonucu kök hücrelerden yeni oluşan pupal orta bağırsak hücrelerinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması ($p \leq 0,05$)

4 TARTIŞMA VE SONUÇ

Holometabol olan ipek böceği *Bombyx mori*'de larval-pupal metamorfoz sırasında meydana gelen en önemli değişimlerden biri orta bağırsak epitelinin hayvanın beslenme koşullarının değişmesinden dolayı yeniden şekillenmesidir. Bu süreç temel olarak iki farklı fizyolojik olay içerir. Birincisi, olgun larval epitelin dejenerasyona uğrayarak bazal tabakadan ayrılması ve lümene itilmesi, diğeri ise pupal epiteli oluşturacak bazal membran üzerinde yerleşim gösteren kök hücrelerin çoğalmaya başlaması ve çoğalan kök hücrelerin farklılaşmasıyla pupal epitelin oluşumudur (Malta et. al., 2017). Yapılan çalışmalar Lepidoptera grubunun orta bağırsak kök hücrelerinin multipotent tipte olduğunu ve omurgalıların kök hücreleri gibi dışsal ve içsel büyüme faktörlerine maruz kalarak farklı hücre tiplerine dönüşüklerini göstermiştir (Slack, 2000; Loeb et. al., 2003).

Yeniden şekillenmenin gerçekleşmesi için iki temel hücre ölüm mekanizması olan apoptoz ve otofaji mekanizmaları beraber larval dokunun dejenerasyonunu sağlamaktadır. Olgun orta bağırsak hücrelerinde gerçekleşen otofaji hücrelerin ölüm sürecinde rol oynamaktadır. Goncu et. al., 2016 yılında yaptıkları çalışmada otofaji ile bağlantılı genler olan ATG 8 ve ATG 12'nin olgun orta bağırsak hücrelerinin yanı sıra bağırsak kök hücrelerinde de özellikle 5. larval evrenin 7. ve 8. günlerinde yüksek olduğu gösterilmiştir. Memelileri de içeren farklı gruplarda yer alan hayvanların kök hücrelerinde yapılan çalışmalar da otofajinin kök hücrelerin kök hücre durumunu korumasında, çoğalmalarında ya da farklılaşmalarında rol oynadığına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Fare embriyonik kök hücrelerinde otofaji mekanizmasında fagofor oluşumunu başlatan komplekste bulunan beclin-1'in mutasyonu sonucunda doku homeostazisinin sağlanamadığı ve farelerin erken embriyonik dönemde öldükleri görülmüştür (Xu et. al., 2002). Sanchez-Dane's et. al., (2012), kök hücrelerde otofajinin, kök hücre olma durumunun korunmasına ve farklılaşmasına katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, var olan literatür bilgisinden yola çıkılarak *Bombyx mori* larval orta bağırsağında yer alan kök hücrelerin pupal epiteli oluşturma sürecinde otofajinin rol oynayıp oynamadığı araştırılmıştır.

Otofaji mekanizmasının kök hücrelerdeki rolünün anlaşılmasında, öncelikle hücrelerde otofajinin engellendiği durumlarda meydana gelen değişimlerin analiz edilmesi önemli bilgiler sağlar. Bu çalışma kapsamında da otofajinin inhibisyonu klorokuin uygulaması sonrası lizozomal pH'nı yükseltmesi ve lizozomal enzim aktivitelerinin inhibe edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Klorokuin, bafilomisin A1, ve hidrosiklorokuin gibi kimyasallar otofajinin geç evre inhibitörleri olarak bilinmektedir. Lizozomal enzimleri inaktive ederek otofagozom-lizozom birleşmesini engellemektedirler (Cicchini et al., 2015).

Bu çalışmanın sonuçlarını değerlendirirken larval-pupal metamorfoz boyunca orta bağırsak kök hücrelerinde gerçekleşen gelişimsel süreç hücrelerde meydana gelen temel morfolojik değişimler göz önüne alınarak iki evre halinde ele alınmıştır. İlk dönem larval kök hücrelerinin büyüüp çoğaldıkları 5. larval evrenin 8. ve 9. günleri ikinci dönem ise çoğalan kök hücrelerin pupal epitel morfolojisi kazanarak farklılaşmaya başladıkları 5. larval evrenin 10. günü ile pupal evrenin 0. ve 24. saatleridir.

Kontrol grubu orta bağırsağında 5. larval evrenin 8. ve 9. günlerinde gerçekleşen en bariz değişim kök hücrelerin hacimlerinin artması ve olgun hücreleri içeren larval orta bağırsak epitelinin altında çoğalmalarıdır. 5. larval evrenin 7. gününde yapılan klorokuin uygulaması sonrasında kök hücrelerdeki büyüme ve çoğalma dikkate alındığında, özellikle 3 mg dozunun kök hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını önemli ölçüde engellediği görülmektedir. Üstelik kontrol grubunda olgun hücrelerin bulunduğu larval epitelde meydana gelen dejeneratif değişimler ve bazal bölgede yerleşim gösteren kök hücrelerin genişleyip çoğalmaları sonrasında gerçekleşen larval epitelin bazal membrandan ayrılması klorokuin uygulamaları sonrasında 9. günde hala gerçekleşmemiştir. Bu morfolojik bulgular klorokuin uygulamasının hem kök hücrelerin büyüüp çoğalmasını hem de larval epitelde dejeneratif değişimleri sekteye uğrattığını göstermektedir. 8. günde gerçekleştirilen uygulamalardan sonra 9. günde belirlenen morfolojiye ilişkin sonuçların 7. günde yapılan uygulamalar ile benzerlik göstermesi bu günde de hücrelerin klorokuin uygulamasına hassasiyetinin var olduğuna işaret etmektedir. Özellikle 3 mg uygulama grubunda kök hücre morfolojilerinin bir önceki güne ait morfolojiye sahip olması artan

madde dozu ile birlikte kök hücrelerdeki büyüme ve çoğalma faaliyetlerinin engellendiğini göstermektedir. Bu gruptan elde edilen sonuçlar da klorokuin'in kök hücrelerin çoğalmaları üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğu ve bunu otofajiyi inhibe etme yoluyla sergilediğini düşündürmektedir. Bazı farklı tipte kanser kök hücrelerinde yapılan çalışmalarda klorokuin uygulamasının bu hücrelerde bölünmeyi inhibe ettiğini göstermektedir. Klorokuin'in hücrelerde hem hücre siklusunda aksamaya neden olduğu hem de otofajiyi inhibe ettiği belirlenmiştir (Jia et. al., 2017).

Histolojik kesitlerde kök hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda ve yuvarlak şekilli "sferit" adı verilen yapılara rastlanmıştır. Bu günde bu yapıların meydana çıkması Turbeck (1974) bu yapıların kök hücrelerin gelişimini sağlayacak olan kalsiyum, magnezyum ve özellikle fosfatları içerdiğini bildirmiştir (Turbeck 1974; Lipovsek et al. 2002; Gomes et al. 2012). Sferit yapıların içinde bulunan fosfatlar farklı metabolik süreçlerde rol alırlar ve bunlardan en önemlisi ATP ve ADP ile ilişkili reaksiyonlardır. Metamorfoz sırasında fosfat formundaki fosforun ATP üretimi için kullanıldığı düşünülmektedir (Franzetti et. al., 2015). Franzetti ve arkadaşları bu hipotezi 2012 yılındaki çalışmasında, ipek böceğinde hücrelerin açlığa maruz kaldığı larval-pupal metamorfoz sürecinde orta bağırsak epitelinde meydana gelen ATP artışıyla desteklemiştir (Franzetti et. al., 2012). Ayrıca yüksek hücre bölünme potansiyeline sahip kök hücrelerde, membran üretimi için gerekli olan fosfolipitleri sentezlemek için de fosfatların kullanılabilmesi düşünülmektedir (Franzetti et. al., 2015).

Morfolojik analizlerin yanı sıra kök hücre gelişiminin 1. evresinde otofaji belirteci olarak asit fosfataz aktivitesi de belirlenmiştir. 7, 8, ve 9. günlerde kontrol grubu larval kök hücrelerin enzim aktivitesinin, olgun larval epitel hücrelerinden daha yüksek miktarda bulunması kök hücrelerde otofajik aktivitenin larval epitel hücrelerine göre çok fazla olduğunu ve bu günlerde gerçekleşen kök hücrelerin büyüme ve çoğalma olaylarında otofaji mekanizmasının rolüne işaret etmektedir. Goncu et. al., (2016) kök hücrelerde otofaji ile bağlantılı genlerin (ATG8, ATG12) 7., 8. ve 9. günlerdeki *Bombyx mori* orta bağırsağında yüksek miktarda ekspresyonunu belirlemiş, kök hücrelerin büyüme ve çoğalmaları için

otofajik aktivitenin önemli olabileceğini öne sürmüştür. Bizim sonuçlarımızda da kök hücrelerdeki enzim aktivitesinin, larval epitel hücrelerine kıyasla daha fazla olması bu görüşü destekler niteliktedir. İnsana ait farklı kök hücrelerinde yapılan çalışmalar otofajinin hasarlı protein ve organelleri ortadan kaldırarak hücre yaşlanmayı geciktirdiği ve hücrenin çoğalma kapasitesini arttırdığı bildirilmiştir. Özellikle embriyonik kök hücrelerde ve hematopoetik kök hücrelerde otofajinin hücre çoğalma aktivitesini düzenleyici fonksiyonları gösterilmiştir (Phadwal et. al., 2013). Bazı kanser hücre tiplerinde de otofajik aktivitenin kaybının hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Guan et. al., 2013). Dolayısıyla kontrol grubunda kök hücrelerin büyüme ve çoğalma faaliyeti gösterdikleri 1. gelişim evresinde asit fosfataz aktivitesinin yüksek olması hücrelerin çoğalma faaliyetleri ile ilişkilendirilebilir. İlginçtir ki, klorokuin uygulaması da kontrol grubu ile benzer olarak larval epitelden çok daha yüksek asit fosfataz miktarlarına neden olmuştur.

1.gelişim evresinde uygulama grupları ve kontrol grubundan elde edilen asit fosfataz miktarları kıyaslandığında 7. günde yapılan 3 mg klorokuin uygulaması dışında diğer uygulamaların asit fosfataz miktarlarını arttırdığı belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmasında klorokuin uygulaması sonrasında hücre içerisinde otofagozom ve otolizozomların birikmesine neden olduğu gösterilmiştir. Lizozomal pH'ın yükselmesi otolizozom içeriğinin sindirilmemesine ve var olan enzimlerin korunmasında rol oynar. Aynı zamanda yapılan çalışmalar klorokuin uygulamasının özellikle lizozomal membran yapısını önemli ölçüde stabilize ettiğini ve lizozomal enzimlerin membran dışına sızmasını engellediğini de göstermiştir (Vernon and Nelson, 1974; Gonzalez-Noriega et. al., 1980). Dolayısıyla larval orta bağırsak kök hücrelerinde klorokuin uygulaması sonrasında asit fosfataz miktarlarının yüksek bulunması kimyasalın hücrelerde ve otofaji mekanizmasında yarattığı etkilerle gerçekleşmiş olması muhtemeldir. Farklı hücre gruplarında lizozomal aktivite sekteye uğradığında hücre içinde lameller cisimciklerin oluştuğu gösterilmiştir. Lameller cisimcikler hücre içinde farklı işlevlere sahiptir ve genellikle lipid depolanması ve salgılanması görevini görmektedir (Schmitz and Müller 1991; Hariri et. al., 2000). Bu yapıların çoklu lamelli lipid membrandan oluştuğu ve içerisinde apolipoproteinler ile litik enzimlerin bulunduğu ve asidik pH'a sahip oldukları gösterilmiştir. Otofajik

aktivitenin bozulmasıyla lameller cisimciklerin arttığına dair birçok araştırma bulunmaktadır. Örneğin, hücre içi fosfolipitleri parçalayan enzimlerdeki bir bozukluk sahip olan Nieman-Pick tip1 hastalığının olduğu durumlarda hücrenin lizozomal bölgelerinde lameller cisimcikler oluşmaktadır (Schmitz & Müller 1991). Siner ve beyin dokusunun dejeneratif süreçleri sırasında, otofajik aktivitenin engellenmesi ya da hatalı lipit taşınımından dolayı lameller cisimciklerin oluştuğu da farklı bir çalışmada gösterilmiştir (Schmitz and Müller 1991). Lizozomal pH'ı yükselten farklı kimyasalların kullanılmasının lizozomlarda hem heterofajik hem de otofajik süreçle biriktirilen fosfolipitlerin metabolik parçalanmalarını engellediği ve bu yüzden de lameller cisimciklerin aşırı birikmesine yol açtığı bildirilmiştir (Joshi et. al., 1989; Schmitz & Müller 1991). Bu sonuçlara benzer bir çalışma Chaanine ve arkadaşları tarafından 2015'de, sıçanlarda yapılmıştır. Kalp kası hücrelerine klorokuin uygulaması hücrelerde bozulmuş mitokondri içeren otofagozomların birikmesine ve içeriğinde lizozomal enzimleri bulunduran lameller cisimciklerin artmasına neden olmuştur (Chaanine et. al., 2015). Civevlere yapılan klorokuin enjeksiyonu sonrası, endotel hücrelerinde asit fosfatazin arttığı, purkinje hücreleri ve endotel hücrelerin sitoplazmasında da lameller cisimciklerin oluştuğu gözlenmiştir (Fischer and Nelson 1974). Bizim çalışmamızda da klorokuin uygulaması sonrası kök hücrelerde otofajik aktivitenin bozulması hücre içinde lameller cisimciklerin miktarının artmasına ve bu cisimciklerin enzim içeriği nedeniyle klorokuin uygulama gruplarında kontrole oranla enzim aktivitesinin artmasına katkısı olabileceği de düşünülmektedir. Ancak bu bulgunun elektron mikroskobu çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

Larval-pupal metamorfoz boyunca larval orta bağırsak kök hücrelerinin gelişimindeki 2. dönem, bu hücrelerin 10. günden itibaren farklılaşmaya başlamasıyla bağırsak lümenini çevrelemeleri ve pupal orta bağırsağa özgü silindirik epitel morfolojisini kazandıkları süreci kapsamaktadır. Klorokuin uygulaması larval-pupal deri değişimini engellemiştir. Bu durumun otofajik sürecin inhibisyonundan mı yoksa klorokuin'in endokrin sistem üzerinde bir yan etki meydana getirmesinden mi kaynakladığı net değildir. Ancak batı mısır kurdu *Diabrotica virgifera virgifera*'de yapılan RNA interferans (RNAi) yöntemiyle DvSnf7 geninin susturulması sonucu böcekte otofajik aktivitenin bozulduğu ve

bunun böceğin ölümüyle sonuçlandığı bildirilmiştir (Koçi et. al., 2014). Morfolojik analizlere ilişkin sonuçlar 7. ve 8. günde yapılan klorokuin uygulamalarının kök hücrelerin farklılaşmasını ve sağlıklı organizasyonunu engellediğini göstermektedir. Hücrelerin düzensiz bir şekilde bazal membran üzerinde dizildiği ve özellikle 7. günde yapılan uygulamalar sonrasında 12. günde çok tabakalı bir hücre yığını haline geldiği belirlenmiştir. Hücre morfolojileri ayrıntılı olarak incelendiğinde 11. ve 12. günlerde hücrelerin nekrotik hücre ölümüne spesifik morfolojiye sahip olmaları, apikal kısımlarındaki membranlarında parçalanma gerçekleşmesi klorokuin uygulaması sonrasında otofajinin inhibisyonun hücrelerde ölüme neden olduğuna işaret etmektedir. Farklı kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda da klorokuin uygulamasının hücreleri nekrotik hücre ölümüne sürüklediğine ilişkin yayınlar bulunmaktadır (Harhaji-Trajkovic et. al., 2012; Fan et. al., 2006). Özellikle hücre içinde lizozomal yapılarının birikmesinin bu tip bir hücre ölümüne neden olduğu düşünülmektedir. Batı mısır kurdu *Diabrotica virgifera virgifera* enterositlerinde gerçekleştirilen çalışmada gen susturma yöntemiyle otofaji engellendiğinde hücrelerde, büyük lizozomlar ve çoklu lameller cisimciklerin oluştuğu; otofagozom-lizozom birleşmesinin engellendiği; hücrenin yavaş yavaş parçalanmaya başlayarak apikal mikrovillusların kaybettiği ve bunların sonucunda hücre membranının bütünlüğünü kaybederek, hücrelerin öldüğü belirlenmiştir (Koçi et. al., 2014). Uygulama yapılan gruplarda larval epitelin bazal tabakadan ayrılmasının gecikmesi larval epiteldeki dejenerasyon sürecinin de klorokuin tarafından sekteye uğratıldığını göstermektedir.

Kök hücrelerde farklılaşma pek çok içsel ve dışsal sinyal ile düzenlenir. Otofajinin insanlarda farklı tipteki kök hücrelerinin farklılaşmasında önemli bir mekanizma olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Otofaji hücrelerin makromolekül üretimi için metabolik öncülleri veya ATP üretmesini sağlayan bir mekanizmadır. Kök hücrelerin farklılaşması sürecinde hücrelerin yeniden programlanmasında da rol oynadığı gösterilmiştir (Vessoni et. al, 2012). Bununla birlikte kök hücrelerin çevresel sinyallerini düzenleyen kök hücre nişi de hücrelerin farklılaşmasında son derece önemlidir. Orta bağırsak kök hücre nişi, hem farklılaşmış silindirik epitel hem de goblet hücrelerinin yanı sıra hemolenften gelen hormonal ve diğer sinyalleşme moleküllerini içermektedir. Larval orta

bağırsak kök hücrelerinin farklılaşmasını uyaracak sinyallerin bir kısmının, olgun orta bağırsak hücrelerinden salınan orta bağırsak farklılaşma faktörleri (MDF) olduğu kanıtlanmıştır (Loeb et. al., 2003). Loeb et. al., (1999)'te yaptığı çalışmada lepidopter grubuna dahil *Heliothis virescens* orta bağırsak hücrelerinden olgun epitel hücrelerini izole etmiş ve bu hücreleri standart besi vasatı içinde kültüre etmiştir. Daha sonra kültürdeki hücreleri besi vasatından uzaklaştırarak santrifüjleme sonucu elde ettiği süpernatantı, başka bir kültür kabındaki orta bağırsak kök hücrelerinin bulunduğu ortama ilave ettiğinde kök hücrelerin farklılaşmaya başladığını gözlemlemiştir. Farklılaşmayı sağlayan faktörleri *Heliothis virescens* ve *Manduca sexta*'da tanımlamışlardır (Loeb et. al., 1999). Bunlar orta bağırsak farklılaştırıcı faktör -1 ve 2 (MDF-1 ve MDF-2) peptidleridir. Bu peptitler hücrede büyüme faktörleri gibi gen aktivasyonunu, transkripsiyonu ve protein sentezini uyarırlar (Hardie, 1991; Loeb et. al., 1999). Klorokuin uygulaması olgun larval epitel hücrelerinde meydana gelen otofaji sürecini de engellediğinden bu hücrelerden gelen ve kök hücrelerin farklılaşmasını sağlayan sinyallerde de bozulmalar olması olasıdır.

Bu sonuçlarla beraber asit fosfataz enzim miktarları değerlendirildiğinde 7. gün 1mg ve 8. gün 1 mg uygulama gruplarında asit fosfataz enzim miktarları kontrol grubundan anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. 7. gün 3 mg uygulama grubunda ise enzim miktarı larvanın 11.günü kontrol grubundan daha yüksektir. Kontrol grubunda 5. larval evrenin 10. gününde belirlenen yüksek asit fosfataz miktarı yüksek otofajik aktiviteye işaret etmektedir. Bu gün farklılaşma periyodunun başladığı güne denk gelmektedir. Dolayısıyla bu bulgu farklılaşma sürecinde otofajinin muhtemel rolüyle ilişkilendirilmektedir. Fare embriyosunda yapılan çalışmalar otofajinin kök hücrelerin erken farklılaşma döneminde gerekli olduğu; farklılaşmanın geç aşamalarında ise fonksiyonu olmadığını göstermiştir (Guan et. al., 2013). Bu yayından yola çıkılarak kontrol grubunda 10. gündeki yüksek asit fosfataz miktarına karşılık pupal evredeki düşük asit fosfataz miktarı bunu destekler niteliktedir. Uygulama gruplarında enzim aktivitelerin farklılıklar göstermesinin kök hücrelerin farklılaşmasının engellenmesi sonucu bu hücrelerin apikal membran yapılarının bozulmaya başlaması ve hücre sitoplazmasının lümenine sızmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Dolayısıyla kök hücrelerin 2. gelişim evresinde asit fosfataz enzim analizinin yanında otofaji analizinde

lizozomların floresans işaretlerle belirleme yöntemi ya da elektron mikroskobu incelemeleri, sonuçları daha güvenilir hale getirecektir.

Genel olarak otofaji mekanizması, fonksiyonu bozulmuş organellerin ve protein agregatlarının ortadan kaldırılmasını sağlayarak, kök hücrelerin kendilerini yenilemesinde, çoğalmalarında ve farklılaşmalarında çok önemli bir mekanizmadır ve kök hücre homeostazisini korumak için kritiktir. Kök hücrelerin biyolojisine ilişkin hem omurgasız hayvanlarda hem de omurgalı hayvanlarda yapılan çalışmalar özellikle son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Kök hücreler sahip oldukları çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri ile canlının yaşamı boyunca yer aldıkları doku ve organlarda sahip oldukları fonksiyonları açısından oldukça önemli hücrelerdir. Kök hücre temelli tedavilerdeki ana engel ise hücrelerin kendini yenilemesi ve çoğalma kapasitesinin kaybedilmesidir (Solitro and MacKeigan 2016). Otofajinin kök hücrelerdeki fonksiyonlarının anlaşılması onların terapi amaçlı daha etkin kullanımlarını sağlayabilir.

Gelecekte kanser ve Alzheimer gibi çok çeşitli patolojik durumların tedavisinde ve yaşlanma sürecinde meydana gelen dejeneratif bozukların iyileştirilmesinde kök hücre ile tedavi alternatifleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu nedenle kök hücrelerin biyolojilerinin, çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarının anlaşılması son derece kritiktir. Bu çalışmada, son derece önemli bir fizyolojik mekanizma olan otofajinin *Bombyx mori*'de pupal orta bağırsağı oluşturan kök hücrelerdeki rolüne ilişkin bulgular elde edilmiştir. Otofajinin kök hücrelerin hem çoğalma hem de farklılaşma sürecinin başlangıcında önemli rolleri olabileceğine ilişkin veriler sunulmuştur. Otofajik sürecin baskılanmasının metamorfozu engellediği ve hayvanın ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Memeli ve böcek kök hücrelerinin benzerlikleri pek çok çalışmada gösterilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen bilgiler tür farkı gözetmeksizin farklı kök hücrelerin biyolojilerinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. İlerleyen çalışmalarda ileri görüntüleme ve moleküler analiz yöntemlerinin kullanılması, otofajinin *Bombyx mori* orta bağırsağındaki kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşması sürecini nasıl düzenlediğine ilişkin mekanistik bilgi elde edilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acorn, John H. Adams, Michael E. Adler, Peter H.,** 2003, Encyclopedia of Insects, 304-305 pp.
- Badadani, M.,** 2012, “Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders,” ISRN Cell Biology, vol., Article ID 927064, 11pp., <https://doi.org/10.5402/2012/927064>.
- 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.
- Casati, B.,** 2014, Molecular and Morpho-Functional Effects Of Starvation On *Bombyx mori* Tissues, International Ph.D. School “Insect Science And Biotechnology” 25th Cycle, University Of Insubria Department Of Biology And Life Sciences.
- Castro-obregon, Susana.,** 2010. The Discovery of Lysosomes and Autophagy., (m), 1–5 pp.
- Chaanine, A. H., Gordon, R. E., Nonnenmacher, M., Kohlbrenner, E., Benard, L., & Hajjar, R. J.** 2015, High- dose chloroquine is metabolically cardiotoxic by inducing lysosomes and mitochondria dysfunction in a rat model of pressure overload hypertrophy. *Physiological reports*, 3(7).
- Cicchini, M., Karantza, V. & Xia, B.,** 2015, Molecular pathways: Autophagy in cancer-A matter of timing and context. *Clinical Cancer Research*, 21(3), 498–504 pp.
- Corley, L.S. & Lavine, M.D.,** 2006, A review of insect stem cell types. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17(4), 510–517 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- 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.
- Fischer, V. W., & Nelson, J. S.** 1974, Chloroquine-enhanced cerebellovascular changes in nutritionally imbalanced chicks. *Acta neuropathologica*, 29(1), 65-72 pp.
- Franzetti, E., Huang, Z., Shi, Y. X., Xie, K., Deng, X. J., Li, J. P., Li, Q. R., Yang, W. Y., Zeng, W. N., Casartelli, M., Deng, H. M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q., Tettamanti, G., Cao, Y., Feng, Qili** 2012, Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, 17(3), 305–324 pp.
- Franzetti, E., Romanelli, D., Caccia, S., Cappellozza, S., Congiu, T., Rajagopalan, M., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Casartelli, M., Tettamanti, G.,** 2015, The midgut of the silkworm *Bombyx mori* is able to recycle molecules derived from degeneration of the larval midgut epithelium. *Cell and Tissue Research*, 361(2), 509–528 pp.
- Geng, J. & Klionsky, D.J.,** 2008, The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “*Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects*” Review Series. *EMBO Reports*, 9(9), 859–864 pp.
- Gilbert, L.I., Bollenbacher, W.E. & Granger, N. a,** 1980, Insect endocrinology: regulation of endocrine glands, hormone titer, and hormone metabolism. *Annual review of physiology*, 42, 493–510 pp.
- Goldsmith, M.R. and Wilkins, A.S.,** 1995, *Molecular Model Systems in The Lepidoptera*, Cambridge University Press, 22 pp.
- Goldsmith, M. R., Shimada, T., & Abe, H.** 2005, The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 71-100 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Gomes F.M., Carvalho D.B., Peron A.C., Saito K., Miranda K., Machado E.A.,** 2012, Inorganic polyphosphates are stored in spherites within the midgut of *Anticarsia gemmatalis* and play a role in copper detoxification. *J Insect Physiol* 58:211–219 pp.
- Goncu, E. & Parlak, O.,** 2012, The effect of the juvenile hormone analog, fenoxycarb, on ecdysone receptor B1 expression in the midgut of *Bombyx mori* during larval-pupal metamorphosis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(1), 52–57 pp.
- Goncu, E., Uranlı, R., Selek, G., Parlak, O.,** 2016, Developmental Expression of Ecdysone-Related Genes Associated With Metamorphic Changes During Midgut Remodeling of Silkworm *Bombyx mori* (*Lepidoptera:Bombycidae*). *Journal of insect science (Online)*, 16(1).
- Gonzalez-Noriega A., Grubb J.H., Talkad V. Sly W.S.** 1980, Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J Cell Biol*; 85:839-52 pp.
- Gözüaçık, D.,** 2011. Otofaji analiz yöntemleri ve uygulama aşamaları. *Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri.*, 129–141 ss.
- Guan, J. L., Simon, A. K., Prescott, M., Menendez, J. A., Liu, F., Wang, F., Zhang, J.,** 2013, Autophagy in stem cells. *Autophagy*, 9(6), 830-849 pp.
- Gullan, Penny J. and Cranston, P.S.,** 2010. The Insects An Outline of Entomology Fourth Edition., 74-78 pp.
- Hakim, R. S., Caccia, S., Loeb, M., Smagghe, G.,** 2009. Primary culture of insect midgut cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 45(3–4), 106–110 pp.
- Hakim, R.S., Baldwin, K. & Smagghe, G.,** 2010. Regulation of Midgut Growth, Development, and Metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, 55(1),

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

ss.593–608. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-112408-085450>.

Hakim, R.S., Baldwin, K.M. & Loeb, M., 2001. the Role of Stem Cells in Midgut Growth and Regeneration 1. *In Vitro Cell. Dev. Biol.--Animal*, 37(6), 338–342 pp.

Hardie DG. 1991, Biochemical messengers: hormones, neurotransmitters and growth factors. London: Chapman and Hall.

Harhaji-Trajkovic, L., Arsikin, K., Kravic-Stevovic, T., Petricevic, S., Tovilovic, G., Pantovic, A., Trajkovic, V., 2012, Chloroquine-mediated lysosomal dysfunction enhances the anticancer effect of nutrient deprivation. *Pharmaceutical research*, 29(8), 2249-2263pp.

Hariri, M., Millane, G., Guimond, M.P., Guay, G., Dennis, J.W., Nabi, I.R., 2000, Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Molecular biology of the cell*, 11(1), 255–68 pp.

Jia, L., Wang, J., Wu, T., Wu, J., Ling, J., & Cheng, B. 2017, In vitro and in vivo antitumor effects of chloroquine on oral squamous cell carcinoma. *Molecular medicine reports*, 16(5), 5779-5786pp.

Joshi, U. M., P. R. S. Kodavauti, V. G. Lockard, H. M. Mehendale. 1989, Fluorescence studies on binding of amphiphilic drugs to isolated lamellar bodies: relevance to phospholipidosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1004: 309-320pp.

Jung, C.H., Ro, S.H.,Cao, J.,Otto, N.M.,Kim, D.H., 2010, MTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, 584(7), 1287–1295 pp. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>.

Karadağ, A., 2016, Otofaji : Programl ı Hücre Ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, Cilt 15, Sayı 2.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Klowden, M.J.**, 2007, *Physiological Systems in Insect*, 298-395 pp.
- Koċi J, Ramaseshadri P, Bolognesi R, Segers G, Flannagan R, et al.** 2014, Ultrastructural Changes Caused by Snf7 RNAi in Larval Enterocytes of Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte). *PLoS ONE* 9(1): e83985. doi:10.1371/journal.pone.0083985
- Lee Y., Jung J., Cho K.J., Lee S.K., Park J.W., Oh I.H, Kim GJ.**, 2012, Increased SCF/c-kit by hypoxia promotes autophagy of human placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells via regulating the phosphorylation of mTOR. *J Cell Biochem* 114: 79-88pp.
- Lipovsek S., Letofsky-Papst I., Hofer F., Pabst M.A.**, 2002, Seasonal- and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gyas annulatus* (Opiliones). *Micron* 33:647–654pp.
- Liu F., Lee J.Y., Wei H., Tanabe O., Engel J.D., Morrison S.J., Guan J.L.**, 2010, FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. *Blood* 116: 4806- 4814 pp.
- Lockshin, R. A. & Williams, C. M.** 1965, Programmed Cell Death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J. Insect Physiol.* 11, 123–133pp.
- Loeb, M. J., Jaffe, H., Gelman, D. B., & Hakim, R. S.** 1999, Two polypeptide factors that promote differentiation of insect midgut stem cells in vitro. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 40(3), 129-140 pp.
- Loeb, M.J., Clark, E.A., Blackburn, M., Hakim, R. S., Elsen, K., Smaghe, G.**, 2003, Stem cells from midguts of lepidopteran larvae: Clues to the

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

regulation of stem cell fate. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 53(4), 186–198 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), 741–752 pp. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2239>.

Malta, J., Heerman, M., Weng, J.L., Fernandes, K.M., Martins, G.F. & Ramalho-Ortigão, M., 2017. Midgut morphological changes and autophagy during metamorphosis in sand flies. *Cell and Tissue Research*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-017-2586-z>.

Nation JL. 2002, Insect physiology and biochemistry. CRC Press.; chapter 2: 28 pp.

Pan, H., Cai, N., Li, M.L., Guang H., Izipisua B., Juan C., 2013, Autophagic control of cell “stemness”. *EMBO Molecular Medicine*, 5(3), 327–331 pp.

Parker, S.P., 1983, Synopsis and Classification of Living Organisms. Volume 1.

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

Phadwal, K., Watson, A.S. & Simon, A.K., 2013, Tightrope act: Autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(1), 89–103 pp.

Romanelli, D., Casartelli, M., Cappelozza, 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(September), 32939 pp. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27609527>.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Romanelli, D., Casati, B., Franzetti, E., and Tettamanti G.,** 2014, A Molecular View of Autophagy in Lepidoptera. *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 902315, 11 pp.
- Rubinsztein D.C.,** 2006, The roles of intracellular protein degradation pathways in neurodegeneration *Nature* volume 443, 780–786 pp.
- Sakurai, A. , Imai, H. , Takenaka, Y. and Sakakibara, M.** 1997, Simulation of citric acid production by rotating disk contactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 56: 689-696 pp. doi:[10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971220\)56:6<689::AID-BIT12>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971220)56:6<689::AID-BIT12>3.0.CO;2-3).
- Sánchez- Danés, A., Richaud- Patin, Y., Carballo- Carbajal, I., Jiménez- Delgado, S., Caig, C., Mora, S., ... & Canals, J. M.** 2012, Disease- specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS- based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO molecular medicine*, 4(5), 380-395 pp.
- 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), 1539–70 pp.
- Singh B.N., Kumar D., Shankar S., Srivastava R.K.,** 2012, Rottlerin induces autophagy which leads to apoptotic cell death through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway in human pancreatic cancer stem cells. *Biochem Pharmacol* 84: 1154-1163 pp.
- Slack JMW.** 2000, Stem cells in epithelial tissues. *Science* 287:1431–1433 pp.
- Smaghe, G., Vanhassel, W., Moeremans, C., De Wilde, D., Goto, S., Loeb, M.J., Blackburn, Michael B. Hakim, R.S.,** 2005, Stimulation of midgut stem cell proliferation and differentiation by insect hormones and peptides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040, 472–475 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Solitto, A. R., & MacKeigan, J. P.** 2016, Leaving the lysosome behind: novel developments in autophagy inhibition. *Future medicinal chemistry*, 8(1), 73-86 pp.
- Terra W.R.,** 2001, The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol.*; 47(2): 47-61. Review.
- Tian, L., Ma, L., Guo, E., Deng, X., Ma, S., Xia, Q., Cao, Y., Li, S.,** 2014, 20-hydroxyecdysone upregulates
 \n Atg\n \n
 genes to induce autophagy in the *Bombyx fat body*. *Autophagy*, 9(8), 1172–1187 pp. Available at:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.24731>.
- Tra, T., Gong, L., Kao, L., Li, X., Grandela, C., Devenish, R.J., Wolvetang, E., Prescott, M.,** 2011, Autophagy in Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE*, 6(11), s.e27485. Available at:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0027485>.
- Turbeck, B. O.,** 1974, A study of the concentrically laminated concretions, 'spherites', in the regenerative cells of the midgut of lepidopterous larvae. *Tissue and Cell*, 6(4), 627-640 pp.
- Vessoni, A.T., Muotri, A.R. & Okamoto, O.K.,** 2012, Autophagy in Stem Cell Maintenance and Differentiation. *Stem Cells and Development*, 21(4), 513–520 pp.
- Walls, Ken C., Ghosh, A.P., Franklin, A.V., Klocke, B.J., Ballestas, M., Shacka, J. J., Zhang, J., Roth, K.A.,** 2010, Lysosome dysfunction triggers Atg7-dependent neural apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), 10497–10507 pp.
- Watt FM, and Hogan BL.** 2000, Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287:1427–1430pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Wigglesworth VB. 1972, Digestion and nutrition. In: The principles of insect physiology. Chapman & Hall (London).; 476-552 pp.

Xu, D., Wilson, T. J., Chan, D., De Luca, E., Zhou, J., Hertzog, P. J., & Kola, I. 2002, Ets1 is required for p53 transcriptional activity in UV- induced apoptosis in embryonic stem cells. *The EMBO journal*, 21(15), 4081-4093 pp.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., Heintz, N., 2003, Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 15077–82 pp