

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**İPEKBÖCEĞİ *BOMBYX MORI* (LEPIDOPTERA:
BOMBYCIDAE) ANTERİOR İPEK BEZİNDE
PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNE
JUVENİL HORMON ANALOĞU
FENOXYCARB'IN ETKİSİ**

Nesrin Ebru GÖNCÜ

Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu : 404.04.00
Sunuş Tarihi : 25 / 08 / 2006

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Osman PARLAK

Bornova-İZMİR

Sayın Nesrin Ebru GÖNCÜ tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak sunulan “**İPEKBÖCEĞİ *BOMBYX MORI (LEPIDOPTERA:BOMBYCIDAE)* ANTERİOR İPEK BEZİNDE PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNE JUVENİL HORMON ANALOĞU FENOXYCARB’IN ETKİSİ**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ve E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve / / 2006 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri**İmza**

Jüri Başkanı :

Raportör Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ÖZET**İPEKBÖCEĞİ *BOMBYX MORI*'DE (LEPIDOPTERA:BOMBYCIDAE)
ANTERİÖR İPEK BEZİNDE, PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNE
JUVENİL HORMON ANALOĞU FENOXYCARB'IN ETKİSİ****GÖNCÜ, Nesrin Ebru**

Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. OSMAN PARLAK

Şubat,2006 200 sayfa

Böceklerde deri değişimi ve metamorfoz ekdisteroidler ve metamorfoz için gerekli ekdisteroid etkilerini engelleyen juvenil hormonla yönetilir. İpek bezi *Lepidoptera* grubu böceklerin larvalarına özgü bir dokudur ve pupalaşmadan hemen önce dejenere olmaya başlar. Ekdisteroidlerden 20-hidroksiekdizonun, *Bombyx mori*'nin son larval evresinde anterior ipek bezinde programlanmış hücre ölümünü tetikleyen steroid hormon olduğu gösterilmiştir. Ekdizonun reseptörlerinde B1 izoformu (EcR B1)'nin özellikle larval dokularda baskın olarak üretildiği tespit edilmiştir. Bir diğer önemli böcek hormonu juvenil hormondur. Bu hormonun *Bombyx mori* anterior ipek bezinde meydana gelen programlanmış hücre ölümündeki rolü henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Fenoxycarb, O-ethyl N-(2-(4-phenoxyphenoxy)-ethyl) carbamate, farklı böcek türlerinde en etkili juvenil hormon analoglarından birisidir. Bu çalışmada, ipekböceği *Bombyx mori* 5.larval evresinde, anterior ipek bezinde meydana gelen programlanmış hücre ölümüne juvenil hormon analogu fenoxycarb'ın etkisi araştırılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Bombyx mori*, ekdizon reseptör B1, fenoxycarb, programlanmış hücre ölümü

ABSTRACT**INVESTIGATION OF JUVENILE HORMONE ANALOGUE,
FENOXYCARB EFFECT ON PROGRAMMED CELL DEATH OF
ANTERIOR SILK GLAND IN BOMBYX MORI
(LEPIDOPTERA:BOMBYCIDAE)****GÖNCÜ, Nesrin Ebru**

Ph., D Biology Section

Supervisor: Prof.Dr. OSMAN PARLAK

February 2006, 202 pages

Insect molting and metamorphosis are orchestrated by ecdysteroids with juvenile hormone preventing the actions of ecdysteroids necessary for metamorphosis. Silk gland is a larval specific tissue of *Lepidopteran* insects and begins to degenerate shortly before pupation. It has been shown that ecdysteroids, especially 20-hydroxyecdysone, are the key steroid hormone for the programmed cell death of anterior silk gland in final instar of *Bombyx mori*. It has been determined that ecdysone receptor isoform B1 (EcR B1) especially expressed predominantly in larval tissues. Another important insect hormone is juvenile hormone. The role of juvenile hormone is not yet clear in programmed cell death of *Bombyx mori* anterior silk gland. Fenoxycarb, O-ethyl N-(2-(4-phenoxyphenoxy) –ethyl) carbamate is one of the most potent juvenile hormone analogues against a variety of insect species. In this study, we have been carried out the effect of fenoxycarb on programmed cell death of anterior silk gland in fifth instar larvae of *Bombyx mori*. This effect has been considered with changes in ecdysone receptor B1, one of the receptor isoform of 20-hydroxyecdysone, which is known to trigger programmed cell death and changes in this physiologic event timing have been determined.

Keywords: *Bombyx mori*, Ecdysone receptor B1, fenoxycarb, programmed cell death

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince, tez çalışmamın her safhasında desteğini yanımda hissettiğim, değerli bilgi ve katkılarını esirgemeyen danışmanım, Sayın Hocam Prof. Dr. Osman Parlak'a, Biyoloji Bölümü ve Zooloji Anabilim Dalı'nın tüm olanaklarını kullanmama imkan tanıyan Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanı Prof. Dr. Gürsel Ergen'e, Zooloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin Arıkan'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında sıklıkla bilgilerine başvurduğum, yardımlarını benden esirgemeyen Prof. Dr. Ayla ÖBER ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Güler ÜNAL'a tezde yer alan fotoğrafların çekiminde yardımlarını esirgemeyen Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Bölümünden Prof. Dr. Tufan Koray'a, Biyoloji Bölümü Başkan Yardımcısı Doç. Dr. Bayram GÖÇMEN'e, Genel Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Melike BOR ve Araş. Gör. Hediye SEKMEN'e laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN'e, Araş. Gör. Gamze TURGAY'a, ve Araş. Gör. Gülçin ITIRLI'ya, Zooloji Anabilim Dalı çalışanlarına ve lisansüstü eğitim yapmakta olan arkadaşlarıma, bugünlere gelmemde emeklerini asla ödeyemeyeceğim aileme - özellikle de anneme-, iyi günde kötü günde verdiğimiz sözü doktora döneminde fazlasıyla yerine getiren; sevgisiyle ve desteğiyle her zaman yanımda olan eşim Mesut GÖNCÜ'ye, doğduğu günden bu yana hayatımıza inanılmaz güzellikler katan, bu çalışmayla birlikte büyüyen -hayatımın uğuru- kızım Ece GÖNCÜ'YE, ayrıca bu çalışmayı 04 Fen 018 no'lu proje kapsamında destekleyen Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığına, TBAG-2430 no'lu proje kapsamında destekleyen TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu'na, 2004 BİL 030 no'lu proje kapsamında destekleyen E.Ü Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XXXV
1.GİRİŞ	1
1.1. Apoptozis.....	6
1.1.1 Apoptozisin Safhaları	6
1.1.2 Apoptozisin Morfolojik İşaretleri.....	7
1.1.3 Apoptozisin Biyokimyasal İşaretleri	8
1.2 Otofaji ve Otofajik Programlanmış Hücre Ölümü	9
1.3. Programlanmış Hücre Ölümü Mekanizmaları.....	12
1.4. Böceklerdeki Hormonlar ve Programlanmış Hücre Ölümüne Etkileri	14
1.4.1. Ekdizon ve Programlanmış Hücre Ölümü.....	16
1.4.2. Ekdizon Reseptörleri	18
1.4.3. Juvenil Hormon ve Programlanmış Hücre Ölümü	20
1.5. <i>Bombyx mori</i> ve İpek Bezi	24
1.6. Fenoxycarb	26

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.MATERYAL –METOD	29
2.1 Materyal	29
2.1.1 Deney hayvanları	29
2.1.2 Deneyde Kullanılan Juvenil Hormon Analogu	29
2.2. Metod	31
2.2.1 Deney Koşulları	31
2.2.2 Fenoxycarb'ın Uygulanması	31
2.2.3 Deneysel Prosedür	32
2.2.4 Total Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi	33
2.2.5 Faz Kontrast Mikroskobu	33
2.2.6. DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektrofrezisi	34
2.2.6.1 DNA İzolasyon Prosedürü ve Kullanılan Reaktifler – Solusyonlar	
2.2.6.1.1 Örneklerin Hazırlanması ve kullanılan solusyonlar	35
2.2.6.2 DNA Agaroz Jel elektrofrezisi	36
2.2.6.2.1 Agaroz Jelin hazırlanması ve kullanılan solusyonlar	36
2.2.6.2.2 Örneklerin hazırlanması ve kullanılan solusyonlar	37
2.2.6.2.3 Örneklerin yüklenmesi ve elektrofrez	38
2.2.7. Histolojik İnceleme	38

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.7.1 Kullanılan boyalar	38
2.2.8. İmmunohistokimya.....	39
2.2.8.1 Kullanılan Solusyonlar ve Reaktifler	40
3. BULGULAR	42
3.1 Uygulama Yapılan Gruplarda 5. Larval Evrede Görülen Değişimler	42
3.1.1 Total Vücut Ağırlıkları	43
3.2 Faz kontrast Mikroskobu Bulguları.....	46
3.3. Histolojik Bulgular	48
3.3.1 Kontrol Grubu	48
3.3.2 (0. Günde 1 ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu	50
3.3.3 (0. Günde 10 ng) Fenoxycarb Uygulama 51Grubu	51
3.3.4 (3. Günde 1 ve 10ng) Fenoxycarb Uygulama	52
3.3.5 (6. Günde 1 ve 10 ng) Uygulama Grubu	52
3.4. İmmunohistokimya Bulguları.....	53
3.4.1 Kontrol grubu	53
3.4.2. (0. Günde 1ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu	53
3.4.3. (0. Günde 10ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu	54
3.4.4. (3. Günde 1ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu	55
3.4.5 (3. Günde 10ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu	55
3.4.6. (6. Günde 1 ve 10ng Fenoxycarb Uygulama Grubu...55	55
3.5 DNA Agaroz Jel Elektforezi Bulguları.....	162

İÇİNDEKİLER (Devam)**Sayfa**

4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	167
4.1 Juvenil Hormon Analöğü Fenoxycarb Uygulamasının 5. Larval Evre Üzerine Etkileri.....	167
4.2 Total Vücut Ağırlıkları	176
4.3 İpek Bezinin Anterior Kısımında Görülen Morfolojik Bulgulara Ait Sonuçlar	178
4.4 Histolojik Bulgulara Ait Sonuçlar	181
4.4.1 Kontrol Grubu.....	183
4.4.2 (0. Günde 1 ng) Fenoxycarb Uygulaması	186
4.4.3 (0. Günde 10 ng) Fenoxycarb Uygulaması	187
4.4.4 (3. Günde 1 ve 10 ng) Fenoxycarb Uygulaması	190
4.4.5 (6. Günde 1 ve 10 ng) Fenoxycarb Uygulaması	191
4.5 İmmunohistokimya Sonuçları.....	192
4.5.1 Kontrol Grubu.....	194
4.5.2 (0. Günde 1 ng) Fenoxycarb Uygulaması	197
4.5.3 (0. Günde 10 ng) Fenoxycarb Uygulaması	198
4.5.4 (3. Günde 1 ve 10 ng) Fenoxycarb Uygulaması	199
4.5.5 (6. Günde 1 ve 10ng) Fenoxycarb Uygulaması	200
4.6 DNA Elektroforez Sonuçları.....	202
KAYNAKLAR DİZİNİ	205
ÖZGEÇMİŞ.....	223

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1	0. günde yapılan fenoxycarb uygulamalarının total vücut ağırlık artışına etkisinin kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.....44
Şekil 3.2	3. günde yapılan fenoxycarb uygulamalarının total vücut ağırlık artışına etkisinin kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.....45
Şekil 3.3	6. günde yapılan fenoxycarb uygulamalarının total vücut ağırlık artışına etkisinin kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.....45
Şekil 3.4	İpekböceği <i>Bombyx mori</i> 'de ipek bezinin anterior kısmının genel yapısı Hem&Eosin. a) 20X; b) 100X.49
Şekil 3.5.	Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> larvasında 5. larval evre 7. gün ipek bezi anterior kısmının. a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik Yapısı.....56
Şekil 3.5.	(Devamı) Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> larvasında 5. larval evre 7. gün ipek bezi anterior kısmında; c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100 X; e) Negatif kontrol.....57
Şekil 3.6.	Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> larvasında 5. larval evre 8. gün ipek bezi anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik Yapısı.....58

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.6. (Devamı) Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> larvasında 5. larval evre 8. gün ipek bezi anterior kısmında; c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X ; e) Negatif kontrol.....	59
Şekil 3.7. Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> larvasında 5. larval evre 9. gün ipek bezi anterior kısmında a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik Yapısı	60
Şekil 3.7. (Devamı) Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> larvasında 5. larval evre 9. gün ipek bezi anterior kısmında; c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X). d) 100X, e) Negatif kontrol.....	61
Şekil 3.8. Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> 'de 10. gün (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmı a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik Yapısı	62
Şekil 3.8. (Devamı) Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> larvasında 5. larval evre 10. gün ipek bezinin anterior kısmı; c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	63
Şekil 3.9. Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> pupa 12. saat ipek bezinin anterior kısmı a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik Yapısı.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.9. (Devamı) Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> pupasında 12. saatte ipek bezinin anterior kısmında; c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100 x; e) Negatif kontrol	65
Şekil 3.10. Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> pupasında 24. saat ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü; b) Histolojik Yapısı.....	66
Şekil 3.10. (Devamı) Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> pupasında 24. saatte ipek bezinin anterior kısmında; c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	67
Şekil 3.11. Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> pupa 36. saatte ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik Yapısı.....	68
Şekil 3.11. (Devamı) Kontrol grubu <i>Bombyx mori</i> pupasında 36. saatte ipek bezinin anterior kısmında; c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X.; e) Negatif kontrol.....	69
Şekil 3.12. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü; b) Histolojik yapısı	70

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.12 (Devamı) 0.gün-1ng uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif Kontrol	71
Şekil 3.13. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü; b) Histolojik yapısı	72
Şekil 3.13 (Devamı) (0.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40x). d) 100X, Ekdizon reseptör B1 (EcR B1), İpek (İ), Kütikula İntima (Kİ), Nukleus (N), c) Negatif kontrol.....	73
Şekil 3.14. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	74
Şekil 3.14 (Devamı) (0.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), d) 100X, e) Negatif kontrol	75
Şekil 3.15. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	76

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.15 (Devamı) (0.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), d) 100X, c) Negatif kontrol.....	77
Şekil 3.16. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	78
Şekil 3.16 (Devamı) (0.gün-1ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X e) Negatif kontrol.....	79
Şekil 3.17. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	80
Şekil 3.17 (Devamı) (0.gün-1ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X, e) c) Negatif kontrol	81
Şekil 3.18. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.18 (Devamı) (0.gün-1ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X) d) 100X e) Negatif kontrol	83
Şekil 3.19. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	84
Şekil 3.19 (Devamı) (0.gün-1ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	85
Şekil 3.20. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	86
Şekil 3.20 (Devamı) (0.gün-10ng) uygulama grubunda 7.günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), d) 100X; e) Negatif kontrol	87
Şekil 3.21. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	88

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.21 (Devamı) (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	89
Şekil 3.22. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	90
Şekil 3.22 (Devamı) (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	91
Şekil 3.23. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda10 günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	92
Şekil 3.23 (Devamı) (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	93
Şekil 3.24. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda11 günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.24 (Devamı) (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	95
Şekil 3.25. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 12 günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	96
Şekil 3.25 (Devamı) (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	97
Şekil 3.26. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 13 günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	98
Şekil 3.26 (Devamı) (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	99
Şekil 3.27. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 14 günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.27 (Devamı) (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	101
Şekil 3.28. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	102
Şekil 3.28 (Devamı) (3.gün-1ng) uygulama grubunda 7 günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	103
Şekil 3.29. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	104
Şekil 3.29 (Devamı) (3.gün-1ng) uygulama grubunda 8 günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X, e) Negatif kontrol	105
Şekil 3.30. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	106

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.30 (Devamı) (3.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi; d) 100X; e) Negatif kontrol	107
Şekil 3.31. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	108
Şekil 3.31 (Devamı) (3.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	109
Şekil 3.32. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	110
Şekil 3.32 (Devamı) (3.gün-1ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	111
Şekil 3.33. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	112

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.33 (Devamı) (3.gün-1ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	113
Şekil 3.34. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	114
Şekil 3.34 (Devamı) (3.gün-1ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.	115
Şekil 3.35. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	116
Şekil 3.35 (Devamı) (3.gün-1ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	117
Şekil 3.36. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	118

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.36 (Devamı) (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	119
Şekil 3.37. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	120
Şekil 3.37 (Devamı) (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	121
Şekil 3.38. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	122
Şekil 3.38 (Devamı) (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	123
Şekil 3.39. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	124

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.39 (Devamı) (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	125
Şekil 3.40. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	126
Şekil 3.40 (Devamı) (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X e) Negatif kontrol	127
Şekil 3.41. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	128
Şekil 3.41 (Devamı) (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	129
Şekil 3.42 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	130

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.42 (Devamı) (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif Kontrol	131
Şekil 3.43 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	132
Şekil 3.43 (Devamı) (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	133
Şekil 3.44. (6.gün-1ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	134
Şekil 3.44 (Devamı) (6.gün-1ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	135
Şekil 3.45. (6.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	136

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.45 (Devamı) (6.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	137
Şekil 3.46. (6.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	138
Şekil 3.46 (Devamı) (6.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40x); d) 100X; e) Negatif kontrol	139
Şekil 3.47. (6.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	140
Şekil 3.47 (Devamı) (6.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	141
Şekil 3.48. (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 12. saatte ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	142

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.48 (Devamı) (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 12. saatte ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi; d) 100X, e) Negatif kontrol.....	143
Şekil 3.49. (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 24. saatte ipek bezinin anterior kısmının b) Histolojik yapısı	144
Şekil 3.49 (Devamı) (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 24. saatte ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	145
Şekil 3.50. (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 36. saatte ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	146
Şekil 3.50 (Devamı) (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 36. saatte ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), d) 100X; e) Negatif kontrol.....	147
Şekil 3.51 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	148

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.51 (Devamı) (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	149
Şekil 3.52 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	150
Şekil 3.52 (Devamı) (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	151
Şekil 3.53 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	152
Şekil 3.53 (Devamı) (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol	153
Şekil 3.54 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	154

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.54 (Devamı) (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.....	155
Şekil 3.55 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 12. saat ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	156
Şekil 3.55 (Devamı) (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 12. saatte ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); d) 100X; e) Negatif kontrol.	157
Şekil 3.56 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 24. saat ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı.....	158
Şekil 3.56 (Devamı) (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 24. saatte ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), d) 100X, e) Negatif kontrol	159
Şekil 3.57 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 36. saat ipek bezinin anterior kısmının a) Faz kontrast mikroskobu görünümü, b) Histolojik yapısı	160

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.57 (Devamı) (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 36. saatte ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), d) 100X, e) Negatif kontrol.....	161
Şekil 3.58 Kontrol Grubu DNA Jel elektroforezi.....	162
Şekil 3.59. 0. gün 1 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi	163
Şekil 3.60 5. larval evrenin 0. günü 10 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi.....	164
Şekil 3.61 5. larval evrenin 3. günü 1 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi.....	165
Şekil 3.62 5. larval evrenin 3. günü 10 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi.....	165
Şekil 3.63 5. larval evrenin 6. günü 1 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi.....	166
Şekil 3.64 5. larval evrenin 6. günü 10 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi.....	166
Şekil 4.1 <i>Bombyx mori</i> 'de 5.larval evre boyunca hemolenf ekdisteroid miktarındaki değişimler	168

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil

Sayfa

Şekil 4.2	<i>Bombyx mori</i> 'de 5. larval evre boyunca juvenil hormon ve juvenil hormon ve juvenil hormon asit miktarları.....	169
------------------	---	-----

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Fenoxycarb Uygulama Tablosu.....	32
Çizelge 3.1 <i>Bombyx mori</i> larvasında örme davranışı ve pupalaşma üzerine fenoxycarb'ın etkisi	43

1. GİRİŞ

Dölllenmiş bir yumurta, tekrarlayan hücre bölünmeleri ve farklılaşmalarıyla çok hücreli ökaryotik bir organizmayı oluşturmak için milyonlarca ya da milyarlarca hücre oluşturur. Bu işlemler boyunca ve ergin oluşumu tamamlandıktan sonra bile çok sayıda zararlı, istenmeyen veya fazlalık olan hücrelerin mutlaka uzaklaştırılmaları gerekir (Kucharova and Farkas, 2002). Programlanmış hücre ölümü bu özellikteki hücrelerin organizmadan uzaklaştırılmaları için oldukça etkili ve evrimsel açıdan son derece iyi korunmuş bir sistemdir. İster omurgalı ister omurgasız olsun, programlanmış hücre ölümü mekanizmaları ve düzenlenişleri birbirine son derece benzerlik gösterir. Genetik olarak düzenlenen hücre ölümü; hayvanlar aleminde, özellikle kurbağa larvalarında kuyruğun, solungaçların kaybı ve spermilerin olgunlaşma süreci, embriyonik gelişim süreci içerisinde parmak arası derisinin kaybı ve parmak formasyonunun oluşturulması, sinir sisteminin şekillendirilmesi, eşey organlarının farklılaşması ve organ-doku boyutlarının belirlenmesi gibi normal gelişimsel işlemlerde rol oynar. Hücre ölümü aynı zamanda gelişim süresince ilerde kanserleşmeye yol açabilecek anormal hücrelerin uzaklaştırılmaları için de son derece önemlidir (Jacobson et., all., 1997; Lee and Baehrecke, 2001).

İpekböceği (*Bombyx mori*) ürettiği ipek salgısı ile ekonomik açıdan önemli olmasının yanı sıra böcek gelişiminin hormonal kontrolünü ortaya koymak için de oldukça sık kullanılan bir materyaldir. İpekböcekleri *Arthropoda* phylumundan *Lepidoptera* ordosuna dahildir. *Holometabola* superordosunda yer alan ipekböceklerinin larval, pupal ve ergin evreleri hem

morfolojik hem de fizyolojik olarak birbirinden farklıdır. Gelişim evreleri içindeki bu farklılaşmalar hormonlar tarafından kontrol edilmektedir (Mayer, 2002). Bu evreler boyunca endokrin sistem ve fonksiyonları üzerine pek çok çalışma yapılmış; endokrin sistemin böcek homeostasinin sağlanmasında, davranış koordinasyonunda ve gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Mayer, 2002). Holometabol böceklerde bu gelişim evreleri boyunca, belli dönemlerde, programlanmış hücre ölümü yoluyla segmentler arasındaki kaslar, motornöronlar, protorasik bez ve bir çift ipek bezi uzaklaştırılır.

Programlanmış hücre ölümü ilk kez 1885’de Flemming tarafından gözlenmiş ve bu durum nukleusun yıkımı anlamına gelen **kromatolizis** (chromatolizis) olarak isimlendirilmiştir. Flemming memelilerin ovaryum folikülleri üzerinde çalışmış ve foliküllerin epitelyal hattındaki hücrelerinde nukleusun yıkıma uğradığını ve sonuçta ortadan kaybolduğunu gözlemiştir. O yıllarda kromatolizis kavramı farklı araştırmacılar tarafından farklı şekillerde kullanılmıştır (Lockshin and Zakari, 2001).

20. yüzyılın başlarında hücre ölüm şekilleri özellikle böcek fizyologları arasında çalışılan bir konu olarak kalmıştır. Örneğin Ilya Mechnikov 1908’de fagositozu keşfederek Nobel ödülünü almıştır. Yine o dönem araştırmacılarından Charles Perez *Calliphora erythrocephala*’nın metamorfozu üzerine bir tez yayınlamış ve özellikle larvanın fagositozla yok edildiğine değinmiştir. O yıllardaki yetersiz histolojik teknikler daha fazla bilgi edinilmesine engel olmuştur. A. Glücksmann adlı araştırmacı ise yaptığı çalışmalarla hücre ölümünün morfogenetik, histiogenetik ve filogenetik amaçlarının olduğunu göstermiştir (Lockshin and Zakari, 2001).

1950'lerin sonlarına doğru DeDuve ve arkadaşları lizozomların varlığını kanıtlamışlar ve buradan yola çıkarak lizozomlardan kaynaklanan hücre intiharı fikrini ortaya atmışlardır. Hücrelerin kendi içlerinde intihar çantaları gibi rol oynayan lizozomların patlamasıyla ölebileceklerini ima etmişlerdir (Lockshin and Zakari., 2001).

1960'larda elektron mikroskobu, histolojik ve histokimyasal tekniklerin gelişmesiyle farklı bilgiler elde edilmeye başlamıştır. Embriyolog W. Saunders (1962) tavuk embriyosunda hücre ölümünün tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir. Böcek fizyologları Kuwana ve Finlayson (1960) pupalaşmadan sonra meydana gelen metamorfik hücre ölümü üzerinde çalışmışlardır. Williams'ın grubu programlanmış hücre ölümü üzerine bir tez hazırlamış; 1963'te bu tezi savunmuş ve yayınlamışlardır. Takip eden yıllarda programlanmış hücre ölümünü düzenleyen mekanizmalar üzerine çalışmalar başlamıştır (Lockshin and Zakari., 2001).

1970'lerde hücre ölümüyle lizozomal aktivite arasındaki bağlantı araştırılmaya başlanmıştır. Örneğin Rudolf Weber (1969) ve farklı araştırmacılar metamorfozda iribaşların kuyruklarında **katepsin** (catepsin) düzeyini ölçmüşlerdir. Ancak hücre ölümü çalışmalarında model olarak timositlerin ve lenfositlerin kullanılmasındaki artışla bu yöndeki çalışmalar geri planda kalmıştır. Çünkü bu hücreler tipik olarak apoptozis gösterirler. Hücre ölümünün bir şekli olan otofajik hücre ölümü günümüzde yeniden gündeme gelmiştir. Böylece 1970'lerde çok farklı gruplar tarafından programlanmış hücre ölümü'nün programlanmış ya da genetik olarak kontrol edilen farklı formları olduğu ve bunların otofaji veya apoptozis olarak farklı yollar takip edebilecekleri gösterilmiştir. Kerr ve arkadaşları (1972) ilk kez "**apoptozis**" terimini kullanmışlardır. Yaptıkları klasik ince yapı çalışmaları

ile iki farklı ölüm tipi olduğunu belirlemişlerdir. Belirledikleri bu iki farklı hücre ölüm tipinden ilki “**nekrozis**” olarak bilinir. Büyük hücre popülasyonlarını etkileyen, organellerin yıkımı ve hücre zarında meydana gelen bozulmalar sonucunda hücre içeriğinin dışarı çıkması ve inflammasyonla son bulan ani hücre ölüm şeklidir. Hücre herhangi bir şekilde bu olayda doğrudan rol oynamaz.

Bu ölüm şeklinden oldukça farklı olan diğer hücre ölüm tipi ise “apoptozis”dir. Genellikle tek bir hücrenin, organel bütünlüğünün bozulmadan kaldığı ancak hücre büzülmesi, hücre membranında tomurcuklanma gibi morfolojik özellikler gösteren ve fagositoz sonucu hücrenin ortadan kaldırılmasıyla sonuçlanan fizyolojik bir olaydır. 30 yıl boyunca hücre ölümü bu şekilde kabul edilmiştir. Kerr ve arkadaşları (1972) yaptıkları çalışmadan elde ettikleri bulgulara dayanarak nekrozisin kontrolsüz bir dejenerasyon olduğu ancak apoptozisin belirlenmiş karakteristiklere sahip bir hücre ölümü programı olduğunu göstermişlerdir (Lockshin and Zakari., 2004; Guimaraes and Linden, 2004)

Bu alanda kullanılan terminoloji ilk kullanımından bu güne evrimleşerek gelmiştir. İlk dönemlerde yapılan çalışmalar, özellikle embriyonik tavuk kanatlarında ve kelebeklerde segmentler arası kaslarda yoğunlaşmıştır. Böceklerin kaslarında, iribaşların kuyruğunda ve glikokortikoidlerle muamele edilen timositlerde mRNA ve protein sentezinin durdurulması hücre ölümünü önlemiş ya da geciktirmiştir. Elde edilen bu bulgularla, hücre ölümünün nekrozisten farklı olarak programlı ve kontrollü olarak meydana geldiği anlaşılmıştır. Böylece programlanmış hücre ölümü “spesifik genlerin aktivitesine gereksinim duyan ve hücreyi ölüme sürükleyen olaylar zinciri” olarak tanımlanabilir (Lockshin and Zakari, 2004).

Böceklerde yapılan programlanmış hücre ölümü çalışmaları 70'li yıllarda özellikle holometabol böceklerde segmentler arası kaslarda meydana gelen dejenerasyonla ilgili olarak yoğunlaşmıştır (Bidlack and Lockshin, 1976; Schlichtig et., all., 1977; Lockshin and Beaulaton, 1979).

Schweichel ve Merker (1973) geliştirmekte olan omurgalı embriyosunda yaptıkları morfolojik çalışmada fizyolojik hücre ölümünün üç farklı tipini belirlemişlerdir. İlk tip üzerinde en fazla çalışılan ve hakkında en çok şey bilinen apoptozisdir. İkinci tip programlanmış hücre ölümü otofajik hücre ölümüdür. Üçüncü ve son tip ise lizozomal aktiviteden bağımsız meydana gelen lizozomal olmayan hücre ölümü tipidir(Lee and Baehrecke, 2001).

1976 yılında *Caenorhabditis elegans* genetik çalışmalar için uygun model organizma olarak seçilmiştir. Sulston ve Horwitz embriyodaki somatik hücrelerin yaklaşık %13'ünün ortaya çıktıktan hemen sonra öldüğünü göstermişlerdir. Bu buluş hücre ölümünün genetik temelini araştırdığı çalışmalarda basit bir model oluşturmuştur (Lockshin and Zakari, 2001).

90'lı yıllarda özellikle, programlanmış hücre ölümünün mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Sinir hücrelerinde, motornöronlarda, kaslarda, protorasik bezde, ovaryumda, tükrük bezinde ve ipek bezinin anterior kısmında programlanmış hücre ölümüne ve mekanizmalarına ilişkin yayınlar bulunmaktadır (Truman, et., all., 1992; Schwartz et. all, 1993; Kobayashi and Ishikawa, 1994; Bothe and Rathmayer, 1994; Jones et. all., 1995; Levine et. all., 1995; Sun et. all., 1996; Löw et. all., 1997; Dai and Gilbert, 1997;; Hoffmann and Weeks, 2001; Zee and Weeks, 2001; Weeks, 2003; Löw et., all., 2005).

90'lı yıllardan itibaren programlanmış hücre ölümüyle ilgili yapılan çalışmalarda gözle görülür bir artış saptanmış ve çıkan yayınlar %20 oranında artmıştır. Günümüzde de programlanmış hücre ölümüyle ilgili çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir (Lockshin and Zakari., 2004).

Hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda doğal olarak meydana gelen programlanmış hücre ölümü; hormonlarla, trofik faktörlerin yokluğuyla ya da hücre-hücre ilişkileri ile tetiklenen gelişimsel bir programın bir sonucudur (Dai and Gilbert., 1998).

1.1 Apoptozis

Apoptozis günümüzde hakkında en fazla bilgiye sahip olunan hücre ölümü şeklidir. Apoptozisin morfolojik, biyokimyasal özellikleri ve safhaları pek çok canlı grubunda oldukça ayrıntılı bir şekilde belirlenmiştir (Guimaraes and Linden 2004).

1.1.1 Apoptozisin Safhaları

Canlıların yaşamlarını normal olarak sürdürdükleri fizyolojik koşullar altında apoptozisin meydana gelmesi ender bir olaydır. Bundan dolayı belli bir dönemde az sayıda apoptotik hücre belirlenebilir. Senkronize bir biçimde apoptozis geçirmeye uyarılan hücrelerden hazırlanan ekstraktlarla yapılan çalışmalarda apoptozisin morfolojik ve biyokimyasal işaretlere dayanılarak safhalara ayrılabilceği gösterilmiştir (Saraste, 1999; Saraste and Pulkki, 2000).

İlk safha başlangıç safhasıdır. Hücre apoptozis için tetikleyici uyarınları alır. Bunu işlem veya etki safhası takip eder. Bu dönemde apoptozisin moleküler mekanizması aktive edilir ve özellikle nükleusta meydana gelen apoptotik değişimler uyarılır. Son safha (indirgenme safhası)da apoptozisin işaretleri belirgin hale gelir, DNA fragmentasyonu ve morfolojik değişimler gözlenebilir (Mills et., all., 1999; Mengubas et., all., 1999; Saraste and Pulkki, 2000). Apoptozisin süresi hücre tipine ve uyarınlara bağlıdır. Yaklaşık 6-24 saat arasında gerçekleşir. Hücre popülasyonlarında apoptotik ölümün asenkronize tabiatının başlangıç safhasının büyük oranda farklılaşmış süresinden kaynaklandığı ve indirgenme safhasıyla karşılaştırıldığında başlangıç safhasının uzun sürdüğü bildirilmiştir (Saraste and Pulkki, 2000).

Tüm bu safhalarda belirlenen apoptotik hücrelere özgü biyokimyasal ve morfolojik değişimler detaylı bir şekilde belirlenmiştir.

1.1.2. Apoptozisin morfolojik işaretleri

Apoptozise yönlenecek bir hücrede ilerleyen apoptozis safhaları boyunca pek çok yapısal değişim gözlenir. Ancak apoptozisin erken safhasında ve yeni oluşturulmuş apoptotik oluşumlarda hücrenin ince yapısının oldukça iyi korunduğu Majno and Joris, (1995); Saraste and Pulkki, (2000) tarafından bildirilmiştir. Apoptotik bir hücrede erken dönemde belirlenen ilk morfolojik işaret keskin sınırlara sahip kümelerde yoğunlaşmış ve ayrılmış kromatin yapısıdır. İlerleyen dönemde nükleusun dış hattı boyunca ve hücre yüzeyinde kıvrımlar meydana gelir. Organellerin bütünlüğünü korumak için sitoplazma yoğunlaşır. Hücrenin komşu hücrelerle ve ekstrasellüler matriksle bağlantısı azalmaya başlar. Bir sonraki safhada nükleus parçalara ayrılır. Bu

duruma **karyorheksis** (karyorrhesis) denir. Sitoplazma iyice yoğunlaşır koyu bir görünüm alır. Kesitlerde yapılan boyamalarla sitoplazma yoğun bir şekilde boyanır. Hücrenin dış taslağı düzensizleşir. Bu durum apoptozise özgü bir durum olan tomurcuklanma sürecini başlatır. Bu apoptotik oluşumlar hücrel organellerce zengindir. Farklı büyüklükte ve kompozisyonda membrana bağlı apoptotik oluşumlar hücre yüzeyinde şişkinlikler şeklinde kendini gösterir. Bu oluşumlar giderek hücreden kopmaya başlar ve yakındaki hücreler tarafından fagositoz yoluyla ya da lizozomal enzimlerin aktivitesi ile yok edilir (McCarthy et., all., 1997; Kiess and Gallaher, 1998; Wickremasinghe and Hoffbrand, 1999; Dinsdale et., all., 1998; Mills, et., all., 1998; Saraste, 1999; Saraste and Pulkki, 2000). Ancak apoptotik oluşumlar lenfositleri ya da nötrofilleri cezbetmez. Bu da apoptotik hücre ölümünün, meydana gelen diğer hücre ölüm tiplerinden bir farkıdır. Majno and Joris, (1995); bu duruma getirdikleri açıklama, “tek başına ölen hücrenin salgıladığı kimyasalların etkin konsantrasyonda vasküler endotelyuma ulaşmadığı” yönündedir. Fagositoz yapan hücreler fagositik hale gelen doku makrofajları veya parenkimal hücrelerdir (Majno and Joris, 1995; Saraste, 1999; Saraste and Pulkki, 2000).

1.1.3 Apoptozisin Biyokimyasal İşaretleri:

Apoptozisin en belirgin biyokimyasal işareti, internukleozomal bölgedeki çift iplikli DNA'nın endojen DNase'lar tarafından 180-200 baz çiftlik kırıklara indirgenmesidir (Majno and Joris, 1995; Saraste and Pulkki, 2000). Bu kırıklar DNA jel elektroforezinde gösterilmiş ve apoptozisin en önemli biyokimyasal işareti olmuştur (Saraste and Pulkki, 2000).

Caspase (kaspaz)'lar adı verilen bir grup proteolitik enzim apoptotik tipte programlanmış hücre ölümünde son derece önemlidir. Bu grup enzimler sistein proteazları olup apoptozisin anahtar proteinleridir. Substratlarını spesifik aspartat kalıntılarında parçalarlar. Ancak apoptotik hücre ölümü caspase'lardan bağımsız da meydana gelir. Bu durumda farklı proteazlar iş görmektedir (Guimaraes and Linden, 2004).

Apoptozisin bir diğer biyokimyasal işareti normalde plazma zarının iç yüzeyinde yerleşim gösteren **fosfatidil serin**'in dış yüzeye çıkmaya başlamasıdır. Bu durum fagositik hücreler tarafından tanınma sinyalini oluşturur (Wickremasinghe and Hoffbrand, 1999; Alnemri, 1999).

Sağlıklı hücrelerde **sitokrom c**, mitokondrinin iç ve dış membranları arasındaki alanda yerleşim gösterir (Goldstein and Waterhouse, 2000). Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya çıkışı apoptozisin bir diğer biyokimyasal işaretidir. Bu salınım apoptotik etkili proteazlar olarak bilinen caspase'ların aktivasyonunda gerekli bir kofaktördür (Vander Heiden and Thompson, 1999). Sitokrom c'nin yanında mitokondri iç membranında yerleşim gösteren ve caspase ailesi proteazlarına dahil olan caspase 9, caspase 2 ve caspase 3'ün de mitokondriden sitozole salındığı ve burada aktive edildiği bildirilmiştir(Alnemri, 1999).

1.2 Otofaji ve Otofajik Programlanmış Hücre Ölümü

Normal gelişimin bir parçası olarak hücre yaşamı, protein sentezi ve yıkımı arasındaki sıkı dengeye bağlı olduğu gibi organel oluşumu ve yok edilmesi arasındaki dengeye de bağlıdır. Proteozom aracılı yıkım, çoğu

proteinin geri kazanılmasından sorumludur. Organellerin oluşum ve yıkımı ise **otofaji**'ye bağlanır.

Otofaji pek çok ökaryotik hücre tipinde meydana gelir; organeller ve diğer hücresel komponentler lizozomların içine alınır ve burada sindirilir. Lizozomlar proteinleri, lipidleri, karbonhidratları ve nükleik asitleri parçalayabilen hidrolazlarca zengin hücresel komponentlerdir. Otofaji boyunca böcek ve memeli gibi organizmalarda otofajik vakuol olarak isimlendirilen çift zarla çevrili vesiküller oluşur. Buradaki zar yapısının kaba endoplazmik retikulumdan orijinlendiğine dair kanıtlar vardır. Oluşan otofajik vakuoller lizozomlarla birleşerek sindirim işlemini gerçekleştirirler (Baehrecke, 2003). Otofaji farklılaşma, metamorfoz, yaşlanma, hücre transformasyonu, gebelik boyunca uterusun gelişiminde olduğu gibi organın bütününde meydana gelen değişimlerde, yavru doğumundan sonra uterusun yine eski haline dönüşünde ki hücre ölümünde rol oynar (Guimaraes and Linden, 2004; W. Bursch, 2004).

Bu şekilde belirlenmiş programlanmış hücre ölümünün ikinci tipi otofajik hücre ölümü olarak bilinir. Bu tip hücre ölümüyle ilgili bilinenler daha azdır. Genel olarak, fazla mitotik aktivite göstermeyen ya da yavaş mitotik aktiviteye sahip hücre, hücre grupları ya da bir dokunun tamamında görülür. Otofajik hücre ölümünde hücrelerin primer lizozomları, otofajik vakuoller ve sekonder lizozomlarını içine alan lizozomal yapıları genişler (Lockshin and Zakari, 2004; Lee and Baehrecke, 2001; Martin and Baehrecke, 2003). Ölmekte olan hücrelerde, hücreyi oluşturan bileşenleri yıkıma uğratma fonksiyonuna sahip büyük otofajik vakuoller oluşur. Böylece hücre kendi kendini yok etmiş olur.

Apoptozis ve otofajik hücre ölümü hayvanların gelişimleri boyunca meydana gelen hücre ölümünün en çok dikkat çeken iki morfolojik formudur (Martin and Baehrecke, 2003). Hücreler intihar etmek için otofajik programlanmış hücre ölümü gibi apoptozisten farklı ölüm yolları seçebilirler. Bunun keşfedilmesinden sonra canlılar dünyasında otofajik hücre ölümünün morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine ilişkin araştırmalar başlamıştır. Otofajik vakuoller ilk olarak böceklerde ve kuşlarda gelişime bağlı programlanmış hücre ölümünde belirlenmiştir. Ancak bugün otofajik hücre ölümünün insanı da içeren farklı organizmaların gelişimi boyunca meydana geldiği belirlenmiştir (Baehrecke, 2003).

Omurgalıların gelişimi boyunca ekstremitelerin şekillenmesi, barsakta lümenin oluşumu da otofajik hücre ölümüyle ilişkilidir. Bu durumlarda gelişimsel program ya da homeostatik mekanizmalar çok büyük miktarda hücrenin yok olmasını gerektirir. Patolojik durumlarda ise bazı nörolojik hastalıkların ilerlemesinde; bazı kanser türlerinin ise kendiliğinden gerilemesinde otofajik hücre ölümü rol oynar (W. Bursch, 2004). *Drosophila*'da tükrük bezinde görülen programlanmış hücre ölümü sırasında yapılan çalışmalar otofajik hücre ölümünün apoptozisle hem benzer hem de farklı tarafları olduğunu göstermiştir. (Martin and Baehrecke, 2003).

1.3. Programlanmış Hücre Ölümü Mekanizmaları

Hücre ölümü mekanizması tüm hücrelerde mevcuttur ancak aktivasyonu, ölüm aktivatörleri ve inhibitörleri arasındaki dengeye bağlıdır. Büyüme faktörleri, DNA'ya hasar veren ajanlar ve hormonlar gibi çok sayıda sinyaller bu düzenleyiciler arasındaki dengeye etki edebilir. Hormonların programlanmış hücre ölümünün kontrolünde anahtar rolü oynadıkları belirtilmektedir (Bredesen et., all., 2003).

Programlanmış hücre ölümünün kontrol mekanizmaları bu alanda çalışan araştırmacıların temel konularından birisi olmuştur. Apoptozisin düzenlenmesinde hücre metabolizması ve hücre biyolojisi düzeyinde çok sayıda faktör etkilidir. Viral enfeksiyon, ani glukoz konsantrasyonları değişimi gibi metabolik değişimler, ısı, radyasyon, toksinler ve ilaçlar gibi faktörler hücreyi programlanmış hücre ölümüne yönlendirebilir. Buna ilaveten sitokinler, steroid ve peptid hormonlar gibi hormonal faktörler hücre ölümü ve hücre çoğalmasında rol oynarlar. Apoptozis için gerekli sinyaller evrimsel açıdan korunmuş hücre içi mekanizmayı harekete geçirir ve bu mekanizma kaspaz aktivitesine etki eder. Apoptozisin düzenleyicileri doğrudan ya da dolaylı olarak kaspaz aktivitesini kontrol etmektedirler. (Kiess and Galleher, 1998). Gerek omurgalı gerekse omurgasızlarda yapılan çalışmaların çoğu, programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesinde hormonların önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Memelilerde de özellikle meme bezi, prostat, ovaryum ve testis gibi dokularda programlanmış hücre ölümünün temel düzenleyicisi steroidlerdir (Kucharova and Farkas, 2002).

Steroid hormonlar programlanmış hücre ölümünü iki zıt mekanizmayla kontrol edebilirler. Genel olarak steroidler yaşam faktörü olarak rol oynarlar. Eksiklikleri programlanmış hücre ölümü için bir sinyal oluşturur. Böceklerde sinir sistemi üzerinde **ekdisterooid**'lerin etkisi, memelilerde **androjen**'ler tarafından prostat dokusunun devam ettirilmesi bu duruma verilebilecek örneklerdir. Steroidlerin varlığı da bazı durumlarda programlanmış hücre ölüm yolunu aktive edebilir. Memelilerde **glukokortikoid hormonlar**; *Drosophila*'da ekdisterooidler orta barsak ve tükrük bezinde programlanmış hücre ölümünü uyarırlar. Steroidlerin organizmada bulunan diğer hormonlarla ilişkileri ve bu hormonların reseptörleriyle olan bağlantıları, programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesinde önemlidir. (Kucharova and Farkas, 2002; Kucharova et., all., 2002).

Hayvanlarda steroidler, programlanmış hücre ölümünün önemli düzenleyicileridir. Nükleer hormon reseptör süper ailesi yoluyla etkisini gösteren bu tip hormonlar –örneğin gonadal steroid hormonlar, glukokortikoidler, tiroid hormonu ve böcek ekdisterooidleri- sinirsel yaşam ve büyüme üzerinde büyük etkilere sahiptir (Hoffman and Weeks, 2001; Martin and Baehrecke, 2003; Lee and Baehrecke, 2001). Steroid hormonlar yüksek organizmalarda farklı gelişimsel ve fizyolojik olayları kontrol eder. Bu hormonlar reseptör proteinlerine bağlanarak dokuya ve gelişim safhalarına spesifik hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlerler (Fujiwara and Ogai, 2001). *Drosophila*'nın gelişimi boyunca larval tükrük bezini de içeren larval yapılarda 20 hidroksi ekdisterooidin hücre ölümünü tetiklediği bulunmuştur (Martin and Baehrecke, 2003; Baehrecke, 2003). Yapılan çalışmalarda *Drosophila* tükrük bezinde görülen otofajik hücre ölümünde de caspase'ların hücre ölümünü kontrol ettikleri gösterilmiştir. (Abraham and Shaham, 2004).

Hormonlar ve programlanmış hücre ölümü üzerine etkileri pek çok canlı grubunda gösterilmiştir.

1.4 Böceklerdeki Hormonlar ve Programlanmış Hücre Ölümüne Etkileri

Holometabola superordosunda yer alan böceklerin larval, pupal ve ergin evreleri hem morfolojik hem de fizyolojik olarak birbirinden farklıdır. Gelişim evreleri içindeki bu farklılaşmalar hormonlar tarafından kontrol edilmektedir (Mayer, 2002). İki temel hormon böcek büyüme ve gelişiminden sorumludur; bunlar steroid **20-hidroksiiekdizon (20E)** ve sesquiterpenoid **juvenil hormon (JH)**'dur.

Bombyx mori'de **ekdizon** birincil olarak protorasik bezde sentezlenir. Çoğu *Lepidoptera* türünde protorasik bezin temel ürünü **3-dehidroksiiekdizon** ve düşük miktarda ekdizondur. 3-dehidroksiiekdizon hemolenfte **3-dehidroksiiekdizon 3 β -redüktaz** tarafından ekdizona indirgenir. Ekdizon periferal dokularda 2-hidroksilasyon ile **20-hidroksiiekdizona** dönüştürülür (Chen et., all., 2001).

Ekdisteroidlerin hem sentezi hem de salınımı **protorasikotropik hormon (PTTH)** adı verilen beyin nörohormonu sayesinde olmaktadır. Bu hormon beyindeki iki çift dorsolateral nörosekresyon hücresi tarafından üretilmektedir (Mizoguchi et al.,1990).

Ekdisteroidler pek çok böcek dokusunda ya da aynı dokuda farklı fizyolojik safhalarda ve gelişim dönemlerinde hormon reseptörlerinden, metabolizmadan ya da içsel faktörlerden kaynaklanan çeşitli morfogenetik etkiler gösterir (Chiang et., all., 1997).

Diğer bir önemli hormon da **corpus allatum**'dan salınan juvenil hormondur ve kimyasal yapısı ilk defa Röller et al.(1967) tarafından belirlenmiştir. Kimyasal yapısına bakıldığında farnesenik asitten türevlenmiş terpenoidlerden olduğu gösterilmiştir. Birbirine benzeyen beş tip juvenil hormon vardır; bunlar juvenil hormon I, II, III, IV ve V olarak isimlendirilirler (Henrich et al .,1976;Palli et al.,1991). Juvenil hormon hücresel düzeyde aktif olmasını sağlayan iki mekanizmaya sahiptir. Bunlardan biri nükleus reseptörlerine bağlanmasını sağlayan steroid yapısı, diğeri ise hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasını sağlayan peptid yapısıdır (Henrich et al .,1976; Yamamoto et al.,1988). Bütün juvenil hormon formları corpora allata'dan sentezlenir. Corpora allata'nın endokrin fonksiyonu ise ilk kez Wigglessworth (1936) tarafından bulunmuştur. Juvenil hormon stabil bir yapıya sahip değildir. Hemolenf içindeki esteraz enzimi ve güneş ışığı ile kolayca indirgenir. Bu nedenle juvenil hormon salındıktan sonra hemolenf içinde bulunan **juvenil hormon bağlanma proteini** adı verilen bir proteine bağlanır. Bu protein hormonu stabilize ederek hemolenf içindeki esterazdan korur (Baker 2003).

Böceklerde deri değişimi ve metamorfoz juvenil hormon ve ekdisteroidler tarafından düzenlenir. Bu iki hormon arasındaki karşılıklı ilişkiyle gelişimin bir sonraki basamağı belirlenir. Steroid karakterli hormonlar olan ekdisteroidler deri değişiminin zamanlamasını ve başlamasını düzenlerken; peptit karakterli juvenil hormon deri değişiminin özelliğini belirler. Hemolenfte juvenil hormon varlığında larva-larva deri değişimi, juvenil hormon yokluğunda ise larva-pupa ya da pupa-ergin değişimi meydana gelir(Gu, et., all, 1996).

Bombyx mori'de son larval deri değişiminden sonra meydana gelen ekdizon ve juvenil hormon salınımları larval-pupal dönüşüm için gerekli fizyolojik ve morfolojik değişimleri sağlar. Bu dönüşüm sırasında hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve hücre ölümleri meydana gelir. Pupal evre için hazırlık işlemleri son larval safhanın başlangıcında gerçekleşir. Son larval safhanın erken dönemleri hormon koşulları açısından diğer genç larval evrelerden farklılık gösterir (Takaki and Sakurai, 2003).

Son larval safhanın erken dönemleri boyunca gözlenen ekdisteroid ve juvenil hormon arasındaki ilişki farklı çalışmalarla ortaya konulmaya çalışılmıştır (Gu et., all., 1997; Dedos and Fugo, 1999; Mizoguchi, 2001; Kamimura and Kiuchi; 2002; Takaki and Sakurai, 2003;).

Böcek yaşamında başlıca fizyolojik olayları yöneten bu iki hormonun programlanmış hücre ölümünde oynadıkları rollere ilişkin pek çok araştırma yapılmıştır (Gu, et., all, 1996).

1.4.1. Ekdizon ve Programlanmış Hücre Ölümü

Steroid hormon sinyali, gelişmiş ökaryotlarda homeostasisin sürdürülmesinde oldukça önemli rol oynar. Gelişim süresince steroidler hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre ölümünü tetiklerler. Farklı steroid hormonlar yüksek omurgalıların gelişiminin düzenlenmesinde rol oynarlar. Örneğin **testosteron** ve **östrojen** cinsiyete spesifik yapıların gelişimini düzenler. Meme gelişimi boyunca testosteron erkeklerde meme bezi hücrelerinin yıkımını tetikler. Dişi meme dokusunda ise östrojen süt salgısının devamını sağlarken epitel hücrelerin ölümünü engeller.

Omurgasız canlılar da gelişimsel değişimleri düzenlemek için steroidleri kullanır ancak tek bir steroid bu işlemler için gerekli sinyallerin çoğunu sağlamaktadır. Böceklerde steroid 20-hidroksiiekdizon; hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümünden sorumludur. Steroid sinyalinin mekanizması *Drosophila melanogaster*'de oldukça fazla çalışılmıştır. Bu mekanizma, dev politen kromozomlara sahip olduğu için *Drosophila* tükrük bezinde açıkça gösterilmiştir. Steroidle uyarılan puf yapıları ekdisteroidle uyarılan transkripsiyonun bir göstergesidir (Lee and Baehrecke, 2001). 3. larval evrenin sonunda ekdizon miktarındaki artışla larval tükrük bezi ve larval orta barsakta meydana gelen programlanmış hücre ölümü arasındaki bağlantı araştırılmıştır (Jiang et., all., 1997; Jiang et., all., 2000; Lee et., all., 2002) . *Drosophila*'da larval orta bağırsağın, tükrük bezinin ve anterior bölgede bulunan kasların ekdisteroidlerle tetiklenen programlanmış hücre ölümü yoluyla dejenere oldukları gösterilmiştir (Jiang et., all., 2000; Lee et., all., 2002; Yin and Thummel, 2005; Cheng-Yu and Baehrecke, 2000; Lee et., all., 2002; Hoffmann and Weeks, 2001; Streichert et., all., 1997). *Manduca sexta*'nın labial bezinde apoptozisin 20E tarafından uyarıldığı bildirilmiştir (Halaby et., al., 2002).

Metamorfoz boyunca böcek sinir sistemi, hormonal olarak kontrol edilen akson ve dendritlerin yeniden düzenlenmesi, yeni sinir hücrelerinin oluşturulması ve gereksiz sinir hücrelerinin programlanmış hücre ölümüyle uzaklaştırılmasını içeren bir organizasyon değişimine uğrar. *Manduca sexta*'nın abdominal motornöronlarında bu şekilde meydana gelen değişimler ve programlanmış hücre ölümü oldukça iyi bir şekilde karakterize edilmiştir (Streichert, et., all., 1997., Zee and Weeks, 2001). Böceklerde ve omurgalı hayvanlarda sinir sisteminin gelişimi üzerinde steroid hormonlarının etkisi

benzerdir. Örneğin Amphibilerde metamorfik değişimler steroid karakterli tiroid hormonu tarafından kontrol edilir(Hoffman and Weeks, 2001).

Larvadan ergine dönüşüm sırasında büyük morfolojik değişiklikler gösteren kanatlar da doku farklılaşmasında ekdisteroid etkilerinin çalışıldığı iyi sistemlerdir (Fujiwara and Ogai, 2001).

Böceklerin çoğunda protorasik bez ergin gelişimi tamamlandıktan sonra dejenere olur. 20-hidroksiekdizon protorasik bezi doğrudan etkileyerek programlanmış hücre ölümünü uyarır. Bu dejenerasyon ergin deri değişiminin başlangıcında juvenil hormon yokluğunda meydana gelir (Dai, and Gilbert, 1996; Dai, and Gilbert, 1997).

Metamorföz sırasında böceklerin iskelet kasında büyük kayıplar meydana gelir. Ergin forma deri değişiminde, segmentler arası kaslar hızlı bir programlanmış hücre ölümü periyoduna girerler ve bunu izleyen 30 saat boyunca kaybolurlar. Bu fizyolojik olay *Manduca sexta*'da oldukça ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Sun, et., all., 1996; Jones and Schwartz, 2000).

1.4.2 Ekdizon Reseptörleri

Gerek omurgalılarda gerekse omurgasızlarda steroid hormonları, tiroid hormonları, retinoidler ve vitamin D küçük hidrofobik moleküllerdir. Kimyasal yapıları ve fonksiyonları nedeniyle birbirlerinden farklıdırlar. Doğrudan hücrenin plazma zarından geçerler ve hücre içindeki reseptörlerine bağlanırlar. Bu reseptörler yapısal olarak birbirleriyle bağlantılıdır ve **nuklear reseptör süper ailesi** olarak isimlendirilirler. Ligandın bağlanmasının reseptör proteinde konformasyonel değişime neden olarak

inaktif formdan aktif forma dönüşümünü gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Kawata et., all., 2001).

Steroidler ve tiroid hormonları gibi gelişimsel hormonlar gelişim olaylarını düzenleyen evrensel kimyasal mesajcılar olarak rol oynarlar. Etkilerinin en merak uyandırıcı özelliği aynı hormon sinyalleri ile muamele edilen farklı hücrelerin önemli derecede farklı tepkiler verebilmeleridir. Bu farklı tepkilerin muhtemel nedenlerinden bir tanesi hücrenin sahip olduğu hormon reseptörlerindeki farklılıktır (Altucci and Gronomeyer, 2001).

Omurgalı hormonları gibi ekdizon da etkisini nuklear reseptör super ailesi üyeleri yolu ile gösterir. Bu nuklear super aile üyeleri ligandla düzenlenen transkripsiyon faktörleridir. Ekdizon reseptörleri N-terminal bölgeleriyle karakterize edilirler ve oldukça iyi korunmuş DNA bağlanma bölgelerine sahiptirler. Primer olarak aktif ekdisteroit olan - 20-hidroksi ekdizon- reseptörüne (EcR) bağlanır. Daha sonra **ultraspiracle** (USP) proteiniyle bir heterodimer oluşturur. USP proteini omurgalı **retinoid X** reseptör proteinine homologdur. Ekdizon reseptör kompleksi DNA'da belli bölgelere bağlanarak genlerin transkripsiyonunu başlatır ya da durdurur (Hall and Thummel, 1998; Hiruma et., all., 1999; Dubrovsky, 2004). Böylece ligandla düzenlenen transkripsiyon faktörlerini oluşturur (Yin and Thummel, 2005; Baker et., all., 2000).

20-hidroksi ekdizon deri değişiminde, larva-pupa ve pupa-ergin dönüşümünde meydana gelen, kompleks morfolojik ve biyokimyasal değişimleri tetikler. 20-E'nun bu çok fazla sayıdaki rollerini ekdizon reseptör kompleksi aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Song et., all., 1997).

Protorasik bezde **ekdizon reseptör (EcR)** kompleksinin oynadığı rol bilinmemektedir. Ancak araştırmacılar eğer bezin aktivitesinin düzenlenmesi sırasında negatif geri bildirim meydana geliyorsa o zaman EcR'nün bu olayda mutlaka rol oynadığı sonucuna varmışlardır (Song et., all., 1997).

Drosophila melanogaster'de yapılan çalışmalarda ekdizonun reseptörünün 3 farklı izoformu olduğu belirlenmiştir. Bunlar ekdizon reseptör A (EcR A), ekdizon reseptör B1 (EcR B1) ve ekdizon reseptör B2 (EcR B2)'dir(Kamimura et al., 1997; Cakouros et., al., 2004).

Böceklerde epidermiste, kanat disklerini oluşturan dokularda ve sinir sisteminde ekdizon reseptör ekspresyonunda pik evresi metamorfozun başlangıcında görülür. EcR'ün de büyük miktarda artışın bulunuşu metamorfik değişimlerin programlanmasında reseptör düzeyindeki yükselişin önemli olduğunu göstermektedir (Fujiwara et., all., 1995).

EcR, hormon yokluğunda hücrenin nukleusunda lokalize olur (Thormeyer et., all., 1999).

1.4.3. Juvenil Hormon ve Programlanmış Hücre Ölümü

Juvenil hormonun belki de en dikkat çekici özelliği böceklerde gelişimsel ve fizyolojik etkilerinin olağanüstü geniş bir aralığa sahip olmasıdır. Larval gelişimin ve metamorfozun kontrolü, erginde üreme, diyapozun kontrolü, göç davranışı, mevsimsel form gelişimi, ve *Hymenoptera*'lerde sosyal yaşamın oluşturulması, juvenil hormonun rol oynadığı belli başlı fizyolojik olaylardır. Tek bir hormonun nasıl olup da bu kadar farklı etkileri olduğu araştırmacılar için hep gizemini korumuştur (Davey, 2000). Juvenil hormonun nuklear reseptörünü arama çalışmaları hep

başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Çünkü juvenil hormon çok sayıda proteine bağlanma kapasitesine sahiptir. Bu proteinler; taşıyıcılar, katabolik enzimler, ekdizon reseptörünün USP parçası, membrana bağlı proteinler ve sitoplazma proteinleridir. Bu bağlanmaların genelde spesifik olmayan bağlanmalar olarak düşünülür (Hiruma et., all., 1999; Wheeler and Nijhout, 2003).

Omurgalı hormonlarının iki temel sınıfı vardır. Bunlar polar olmayan; ancak lipidlerde eriyebilen steroidler ve polar, suda eriyebilen peptidlerdir. Juvenil hormon bu sınıflardan hiçbirine dahil olmayıp; hayvan hormonları arasında oldukça ender görülen bir yapıya sahiptir. Kimyasal yapısına bakıldığında bir terpen molekülüne üç isopren'in bağlanması ile oluşmuş sesquiterpenoid yapıdadır. Terpenoid molekülleri ve türevleri hayvanlar arasındaki iletişimde rol oynar. Sesquiterpenoidler ise bitkilerde ve mantarlarda oldukça fazla görülür. Juvenil hormonun üç farklı tipi vardır ve juvenil hormon I, II ve III olarak isimlendirilirler. Bunlar ilave etil ve metil gruplarıyla farklılaşırlar (Wheeler and Nijhout, 2003).

Yağda eriyebilmeleri ve biyosentetik olarak izledikleri yol ile, steroidlerin sahip oldukları bazı özelliklere sahiptirler. Steroid hormonlar nuklear reseptörleri aracılığı ile etki gösterdikleri gibi membran reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen farklı etki mekanizmasına da sahiptirler. Örneğin östrojen steroid hormon olmasına rağmen membran reseptörleri aracılığı ile etkisini gösterir. Wheeler ve Nijhout'a (2003) göre juvenil hormon oldukça farklı ve geniş bir sınıf olan lipid sinyal molekülleri sınıfının bir üyesidir; bu sınıf üyeleri sinyal iletimine ve transkripsiyonun düzenlenmesine katılırlar. Bununla birlikte terpenoid temelli bileşikler eski RNA dünyasından gelişen sinyal molekülleridir. Bundan dolayı potansiyel olarak mRNA üzerinde rol oynayabilirler (Wheeler and Nijhout, 2003).

Juvenil hormonun farklı gelişimsel etkileri vardır ancak temel rolü ekdizonun etkisini düzenlemesidir. 20E'nin etki mekanizmaları çok detaylı çalışılmış olmasına rağmen juvenil hormonun moleküler düzeyde etki mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (Dubrovsky E., B., 2004). Juvenil hormonun etki mekanizmasının steroid hormonlarla benzer olduğu düşünülmektedir. Klages (1980) ve Engelman (1981) tarafından sitoplazmik juvenil hormon reseptörleri belirlenmiştir. Ancak juvenil hormon reseptör kompleksinin kromatinle bağlantısı ve transkripsiyona neden olan protein-juvenil hormon kompleksi belirlenememiştir (Sehna, 1984). Juvenil hormon tarafından transkripsiyonun uyarıldığı farklı böceklerde yağ dokusunda gösterilmiştir. Örneğin *Galleria*'nın ipek bezinde juvenil hormon ipek proteinleri için kodu oluşturan poly(A) RNA'nın sentezini beş kat arttırmıştır. Hücre membranındaki etkisi de deneysel olarak gösterilmiştir. *Rhodnius*'da foliküler epitel boyunca vitellogeninin taşınımında JH'nun rol oynadığı düşünülmektedir. Corpora allata ekstratları ile yapılan çalışmalarda juvenil hormonun mitokondriyal solunum üzerinde de etkili olduğu bulunmuştur. Saf juvenil hormon in vitroda fare karaciğer mitokondrilerinde solunumu arttırmaktadır (Sehna, F., 1984).

Juvenil hormon böceklerde gelişim, metamorfoz ve üremede oldukça önemli role sahiptir (S.G. Dedos et.al, 2002; Kamimura M., et al., 1998). Deri değişimi ve metamorfoz süreçleri içerisinde deri değişiminin karakteristiklerini belirler: juvenil hormon varlığında meydana gelen ekdizon salınımları larval – larval deri değişimlerini tetikler, ancak juvenil hormon yokluğunda meydana gelen salınımlar ise larval- pupal ya da pupal- ergin dönüşümleri sağlar (Riddiford, 1985 ; Kamimura., 1998). Nijhout ve Williams (1974) ilk kez *Manduca sexta*'da 5. larval evrenin başlangıcında juvenil hormon düzeyindeki düşüşün prothorasikotropik hormon (PTTH)

salınımına izin veren endokrin bir sinyal olduğunu göstermişlerdir (Dedos et all, 1999). 5. instarda beyin – corpora cardiaca- corpora allata kompleksinden salınan PTTH larval-pupal değişimi başlatan endokrin olayları tetikler. Böceklerde PTTH, protorasik bezi ekdizon salgılaması için uyarır. PTTH salınımının zamanlamasının düzenlenmesi ve mekanizmaları ile ilgili çok az şey bilinmektedir. Yapılan çalışmalar juvenil hormonun bu düzenlemeyi yapabileceğini göstermektedir. Ancak *Bombyx mori*'de yapılan çalışmalar 5.larval evrenin erken dönemlerinde JH-1'in PTTH salınımına etkisi olmadığını göstermiştir.

1974 yılında Nijhout ve Williams, *Manduca sexta*'da 5. larval evrenin erken dönemlerinde juvenil hormon miktarındaki azalmanın protorasikotropik hormon salınımına izin veren gelişimsel ve fizyolojik olayı sağlayan endokrin sinyal olduğunu ilk kez göstermişlerdir. 5. larval evrenin erken dönemlerinde beyin-corpora cardiaca-corpora allata kompleksinden salınan PTTH larval-pupal farklılaşmanın başlangıcıyla sonuçlanan endokrin olaylar dizisini tetikler. PTTH salınımının zamanlamasının düzenlenmesi hakkında çok az şey bilinmektedir. *Lepidoptera*'da juvenil hormonun son larval safhada PTTH salınımını inhibe ettiği bildirilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar en azından *Bombyx mori* için bunun doğru olmadığını göstermektedir. Aksine beslenme safhası boyunca JH1 uygulaması hemolenfteki PTTH miktarını artırır. PTTH seviyesindeki bu yükselme salgılamının uyarılmasından ya da PTTH eliminasyonunun baskılanmasından veya her ikisinden de kaynaklanabilir. Ancak bu mekanizmanın nasıl gerçekleştiği tam olarak aydınlatılamamıştır. Bazı *Lepidoptera* türlerinde son larval safhanın beslenme periyodu boyunca juvenil hormon ya da analoglarının uygulanması larval-pupal dönüşümün başlamasını geciktirir. Juvenil hormon 1 uygulamasını takiben larval-pupal

dönüşümünde 3 farklı sebepten gecikme meydana gelebilir. İlk olarak hormon beyin üzerinde rol oynayarak PTH salgılanmasını baskılar. İkinci olarak protorasik bez üzerinde rol oynar ve protorasik bezin PTH'a tepki vermesini önleyebilir ya da basitçe ekdizon salınımını baskılayabilir. Üçüncü olasılık ise ekdisteroidlerin hedefi olan dokular üzerinde rol oynar ve ekdisteroidlere yanıt yeteneğini baskılar (Mizoguchi A., 2001).

Juvenil hormonun programlanmış hücre ölümüne etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda ise bu fizyolojik olayı geciktirdiği ya da baskıladığı bulunmuştur (Dai and Gilbert, 1998; Capella and Hartfelder, 1998; Kakei et., all., 2005).

1.5. *Bombyx mori* ve İpek Bezi

İpekböceği *Bombyx mori*'de ipek bezi vücudun sağ ve sol tarafında ventro-lateral bölgede yerleşim gösteren, larvaya spesifik, tüpsü yapıya sahip bir organdır ve pupalaşmadan kısa bir süre sonra dejenere olur. İpek proteinlerini üretmek üzere özelleşmiştir. Anatomik ve fizyolojik olarak üç kısma ayrılır. Anterior kısım, orta kısım ve posterior kısım (Tsuzuki et., all., 2001). Orta bölge ve posterior bölge ipek proteinlerinin üretiminden sorumludur. Posterior kısım **fibroin**, orta kısım ise **sericin** (serisin) proteinini sentezler. Anterior bölgenin ipek proteini üretme fonksiyonu yoktur. Görevi lümene salgılanan ipeği, örme işleminde ağız aletlerine iletmektir (Azuma and Ohta, 1998). İpek bezini oluşturan hücrelerin bölünmeleri embriyonik safha ile sınırlıdır. Larval gelişim boyunca hücrelerin büyüklükleri artar. DNA replikasyonu hücre bölünmesi olmadan devam eder. Bundan dolayı hücreler poliploid duruma gelirler (Sudhakar and Gopinathan, 2000; Dhawan and Gopinathan, 2003). İpek bezlerinin fonksiyonu ve gelişimi hormonların

kontrolü altındadır. Fonksiyonu larval gelişim boyunca juvenil hormon tarafından sınırlanır. Düşük miktardaki ekdisteroidler uygun ipek bezi fonksiyonu için gereklidir. Deri değişimleri boyunca ipek bezi varlığını sürdürür ve deri değişiminden hemen sonra da fonksiyonunu geri kazanır. Ancak pupal deri değişimi boyunca dejenere olmaya başlar (Kodrik and Sehnal, 1994).

İpekböceği *Bombyx mori*'de ipek bezinin anterior kısmı uniform, tek tabaka halinde dizilmiş, altıgen hücrelerden oluşan ince tüpsü bir kanaldır. Yaklaşık 0.5 mm çapa sahiptir. Hücrelerin apikal yüzeyi kütikula intima ile sınırlanmıştır. Bezin lümeni ise sıvı halde bulunan ipek ile doludur (Azuma and Ohta, 1998; Akai, 1998; Takayashi M., et. all., 2002).

Pupal değişimin hormonal kontrolü ve zamanlaması epidermis ve kanat diski gibi dokularda iyi bir şekilde belirlenmiştir. Bir dokuda ölmekte olan hücreler çoğunlukla sağlıklı olan hücreler arasında dağılmış halde bulunur. Bundan dolayı fizyolojik ve gelişimsel analizleri gerçekleştirmek ve yorumlamak zordur. Bu tip bir sınırlamaya sahip olmayan gelişimsel sistemlerden birisi ise ipek bezinin anterior kısmıdır (Kakei et., all., 2004). Larval deri değişimi ve pupal dönüşüm sırasında farklı morfolojik değişimler gösterir. Bu morfolojik değişimler 20E ve juvenil hormon uygulamalarıyla yeniden düzenlenebilir. Bundan dolayı anterior ipek bezi larval deri değişimi ve metamorfozda hormonal etkilerin analiz edilmesi için iyi bir model oluşturur (Takayashi M., et. all., 2002).

1.6. Fenoxycarb (O-ethylN-(2-(4-phenoxyphenoxy)ethyl) carbamate

Juvenil hormonun böcek gelişimini düzenlemede oynadığı rolün anlaşılmasında juvenil hormon aktivitesine sahip sentetik böcek büyüme düzenleyicisi sınıfının yani juvenil hormon analoglarının geliştirilmesi oldukça etkili olmuştur (Dedos. et. all, 2002; Wilson, 2004). Pek çok böcek türünde larval gelişim süresince juvenil hormon analoglarının uygulanması endokrin dengeyi alt üst eder ve sonuç olarak anormal gelişime neden olur (Kamimura. et. all., 1998; Dedos. et. all., 2002, Dedos. et. all, 1999; Kamimura and Kiuchi., 2002; Wilson, 2004). Son larval evrenin erken dönemlerinde yapılan uygulamalar larval safhanın uzamasını sağlayabilir ve böylece larval-pupal değişiminin başlamasını durdurur (Kamimura et. all., 1998; Dedos et. all, 1999 ; Dedos et all, 2002).

Fenoxycarb nörotoksik olmayan ancak pek çok böcek türünde etkili juvenil hormon analoglarından biridir (Leonardi et., all., 1996; Kamimura et all, 1998; Monconduit and Mauchamp, 1999). Fenoxycarb geniş spektrumlu bir böcek büyüme düzenleyicisidir. Karbamat yapısından dolayı anti-kolinesteraz aktivitesine sahip olmadığı için nörotoksik değildir. Tarım zararlıları ile mücadele de sıklıkla kullanılır. Deri değişimi ve üreme gibi fizyolojik işlemler üzerinde juvenil hormonun etkilerini taklit eder. Juvenil hormonun fizyolojik etkilerini taklit etme yeteneğinden dolayı juvenil hormon analogu olarak isimlendirilir. Fenoxycarb juvenil hormonun reseptörüne bağlanır ancak juvenil hormon esteraz tarafından yıkılmaz.

Fenoxycarb gibi juvenil hormon analoglarının yüksek düzeyde ileri larval evrelerde uygulandığında larval karakterlerin devamına neden olur. Bu böcekler üreyemez.

Fenoxycarb'ın suda çözünürlüğü oldukça düşüktür. Toprağa güçlü bağlanma eğilimi gösterir. Bundan dolayı yeraltı sularına bulaşması pek mümkün değildir. Toprakta fenoxycarb hidrolizis ile yıkıma uğrar. Fenoxycarb bitkilerde nispeten hızlı bir şekilde yıkıma uğrar. Memelilerde ve kuşlarda düşük toksisiteye sahiptir (Sullivan, 2000).

Fenoxycarb'ın etki mekanizmasına ilişkin yapılan çalışmalarda juvenil hormonu taklit mi ettiği yoksa juvenil hormonun hemolenfte bulunma durumunu mu uyardığı tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak terponoid olmayan kimyasal yapısından dolayı juvenil hormonu taklit edemeyeceği düşünülmektedir. Fenoxycarb uygulanan ipekböceği larvalarındaki juvenil hormon miktarı oldukça yüksek bulunmuştur. Bundan dolayı fenoxycarb'ın juvenil hormon sentezini uyarıcı ya da juvenil hormonun yıkımını engelleyici bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Monconduit ve Mauchamp (1999) ise yaptıkları çalışmada fenoxycarb'ın juvenil hormonu taklit ettiğini göstermişlerdir (Monconduit and Mauchamp, 1999).

İpekböceği *Bombyx mori* fenoxycarb'a oldukça hassastır. Pikogram düzeyinde fenoxycarb'ın 5. larval evrenin 0. gününde topikal olarak ya da diyetle uygulanması evrenin süresinin uzamasına ve uygulanan doza bağlı olarak normal pupalaşmanın baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir (Monconduit and Mauchamp, 1998; Dedos, 1999; Kamimura and Kiuchi., 2002; Dedos, et., al., 2002). Uygulanan fenoxycarb'ın önemli bir kısmı feçes ile uygulamadan 48 saat sonra %99 oranında vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Juvenil hormon analoglarının bu yüksek potansiyeli, metabolik olarak stabil molekül olmalarından kaynaklanır (Dedos et all, 2002).

Bombyx mori'nin farklı evrelerinde ve bu evrelerin farklı zamanlarında fenoxycarb uygulandığında meydana gelen değişimler farklı yayınlarla gösterilmiştir .(Kamimura, 1995; Leonardi et., all., 1996; Kamimura and Kiuchi, 2002; Dedos et., all., 2002; Dedos et., all, 2002; Monconduit and Mauchamp, 1999; Takahashi et., all., 2003 Dedos and Fugo, 1999)

Araştırmamızın amacı *Bombyx mori*'de 5. larval evrenin 0. 3. ve 6. günlerinde uygulanan iki farklı dozda juvenil hormon analogu fenoxycarb'ın ipek bezinin anterior kısmında meydana gelen programlanmış hücre ölümüne etkisini göstermektir. İpek bezinin anterior kısmında meydana gelen programlanmış hücre ölümünü tetiklediği bilinen 20-hidroksiekdizonun reseptör izoformlarından biri olan EcR B1 üzerinde fenoxycarb'ın meydana getirdiği etki ve meydana gelen reseptör değişimlerinin immunohistokimyasal olarak belirlenmesi planlanmıştır. Kontrol ve fenoxycarb uygulanan hayvanlarda ipek bezinin anterior kısmı faz-kontrast mikroskopunda incelenerek karşılaştırılmıştır. Programlanmış hücre ölümünün zamanlamasında meydana gelen değişimler ise ipek bezinin anterior kısmından elde edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesiyle ortaya konmuştur.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1. Deney Hayvanları

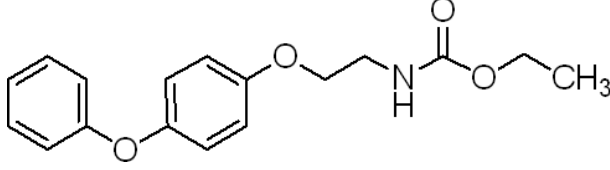
Bu çalışma için ipekböceği (*Bombyx mori*) larva ve pupaları kullanılmıştır Bursa İpekböcekçiliği Araştırma Enstitüsü ve Bursa Kozabirlik'ten temin edilen hibrid ipekböceği yumurtaları, 8-10 günlük bir inkübasyondan sonra ipekböceği kültür laboratuvarında beslemeye alınmıştır.

2.1.2. Deneyde Kullanılan Juvenil Hormon Analogu

Deneylede ticari olarak elde edilen juvenil hormon analogu "fenoxycarb" (ethyl[2-(4-phenoxy-phenoxy)-ethyl]carbamate (Riedel, 31343) kullanılmıştır. Fenoxycarb (C₁₇H₁₉NO₄) ilk kez 1981 yılında keşfedilmiş ve 1987'de İngiltere Ürün Koruma Konseyi'nden R. Maag AG tarafından tanıtılmıştır. Fenoxycarb nörotoksik olmayan karbamat böcek büyüme düzenleyicisidir. Çok geniş aralıkta tarım zararlılarının kontrolünde kullanılmaktadır. Özellikle zeytin, pamuk ve meyva ağaçlarında ateş karıncaları, sivrisinekler, pire, hamamböceği, kelebeklerin kontrolünde kullanılır.

Fenoxycarb

Kimyasal formülü:



Kimyasal adı:

Ethyl[2-(4-phenoxy-phenoxy)-ethyl]carbamate

Fiziko-kimyasal özellikleri:

Molekül formülü: C₁₇H₁₉NO₄

Molekül ağırlığı: 301.30

Suda çözünürlüğü: 6mg/ml, 20 °C'de

Erime noktası: 53-54 °C

Çevresel ömrü:

Hidrolizle yarı ömrü: 3136 gün (pH 7)

Suda fotoliz: 18-23 gün (pH 7)

Toprakta fotoliz: 6-14 gün primer

73-1351 gün sekonder

Alanda dağılma yarı ömrü: 3-5 gün primer

13-14 gün sekonder

Aerobik suda yarı ömrü: 19 gün

Aerobik toprakta yarı ömrü: 254 gün

Ananerobik toprak yarı ömrü: 113 gün

Toksisite:

Akut oral LD₅₀(sıçan): >10.000 mg/kg

Akut dermal LD₅₀(tavşan): >2000 mg/kg

Akut solunum LC₅₀(sıçan): >3.48 mg/l hava – 4 saat

Ekolojik etkileri:

Akut toksisitesi:

Gökkuşığı alabalığı -96 saat- LC₅₀: 1.6 ppm (Sullivan, 2000)

Daphnia magna – 48 saat- LC₅₀: 0.6 ppm (Sullivan, 2000)

2.2 Metod**2.2.1 Deney Koşulları**

İpekböceği kültür laboratuvarı, ipekböceklerinin sağlıklı ve optimum koşullarda yetiştirilebilmesi için düzenlenmiştir. Laboratuar ısısı 25±1°C ve nem %75-80 seviyesine ayarlanmıştır. Hayvanlar taze dut yapraklarıyla ve günün aynı saatlerinde olmak üzere günde üç kez beslenmişlerdir. 21 gün sonra 5. larval evreye geçen ipekböcekleri her birinde 150 hayvan (n=150) olan 8 gruba ayrılmıştır.

2.2.2. Fenoxycarb'ın Uygulanması

Juvenil hormon analogu fenoxycarb 1 ng/10µl ve 10 ng/10µl olmak üzere iki farklı konsantrasyonda asetonda çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan solusyonlar, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Fenoxycarb uygulanan günler ve miktarlar literatüre dayanılarak belirlenmiştir. 5. larval evrede gruplara ayrılan hayvanlara yapılan reaktif uygulamasının zamanı ve miktarı çizelge 2.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1 Fenoxycarb uygulama tablosu. * Hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubu,
** Aynı miktarda aseton uygulanan ancak reaktif uygulanmayan negatif kontrol grubu

DENEY GRUBU (her bir grupta 150 hayvan)	UYGULAMA ZAMANI (5. larval evre)	UYGULANAN DOZ (ng)	Kontrol grubu *
1. Deneysel Grubu	0. gün	1	Negatif kontrol grubu **.
2. Deneysel Grubu	0. gün	10	
3. Deneysel Grubu	3. gün	1	
4. Deneysel Grubu	3. gün	10	
5. Deneysel Grubu	6. gün	1	
6. Deneysel Grubu	6. gün	10	

2.2.3 Deneysel Prosedür

Her bir uygulama için 150 hayvandan oluşan gruplar oluşturulmuştur. Uygulama yapılan gruplar dışında kontrol grubuna aynı gün ve miktarlarda sadece aseton uygulanmıştır. Bir grup ise hiçbir uygulamaya tabi tutulmamıştır. Hayvanlar 7. güne geldiklerinde bu gruplardan 15 hayvanın her gün disseksiyonları yapılmıştır. Sabah ilk beslemeden önce rastgele seçilen hayvanların ağırlıkları kaydedilmiştir. Seçilen hayvanlardan disseksiyonla alınan ipek bezlerinin anterior kısımları fizyolojik suyu içerisine alınmıştır. 2-3 hayvanın ipek bezleri fizyolojik su içerisinde faz-kontrast mikroskobu çekimleri yapıldıktan sonra toplam 7 hayvandan alınan ipek bezinin anterior kısımları histolojik ve immunohistokimyasal inceleme

için fiksatif (Bouin) içerisine alınmıştır. DNA elektroforezinde kullanılacak ipek bezleri aseptik olarak alınmaya çalışılmıştır. Disseksiyondan önce kesim yapılacak bölge, makas ve pensler %70 alkolle temizlenmiştir. Böcek fizyolojik suyu ile yıkanan ipek bezlerinin anterior kısımları steril ependorf tüplere alınmış ve -20°C'de saklanmıştır.

2.2.4 Total Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi

Deney hayvanlarından 5. larval evrenin 7.gününden itibaren rasgele seçilen 10 hayvan her gün sabah ilk beslemeden önce tartılmıştır. Elde edilen veriler kaydedilerek farklı günlerde ve farklı dozlarda uygulanan juvenil hormon analogu fenoxycarb'ın etkisiyle meydana gelebilecek değişimler hem kontrol grubuyla hem de uygulama yapılan grupların kendi içlerinde karşılaştırılmasıyla takip edilmiştir.

2.2.5 Faz-Kontrast Mikroskobu

5. larval evrenin 7. gününden itibaren kontrol grupları ve juvenil hormon analogu fenoxycarb uygulanan hayvanların ipek bezlerinin anterior kısımlarını morfolojik olarak incelemek ve gruplar arasında karşılaştırma yaparak fenoxycarb'ın ipek bezi üzerinde morfolojik etkilerini günlere ve uygulanan doza bağlı olarak belirleyebilmek amacıyla taze dissekte edilen ipek bezlerinin anterior kısımlarının böcek fizyolojik suyu içerisinde faz—kontrast mikroskobu çekimleri yapılmıştır.

Böcek fizyolojik suyu: 7.5 gr NaCl, 0.35 gr KCl, 0.21 gr CaCl₂ 1000 ml distile suda çözündürülür.

2.2.6 DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi

DNA izolasyonunun yapılmasında Sambrook et., all (1989) fenol – kloroform ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.

2.2.6.1 DNA İzolasyon Prosedürü ve Kullanılan Reaktifler - Solusyonlar

1- Örnekler 1ml'lik ependorf içerisine alınır. 300 µl homojenizasyon tamponu ve 30 µl proteinaz K (Sigma, P4850) ilave edilir. Solusyon karıştırılır. Total hacim 330 µl olur.

2- Homojenat gece boyu 37 °C'de veya 50 °C'de inkübe edilir.

3- 200 µl fenol (NaOH eklenmiş ve pH:8; Sigma, P 4557) ve 200 µl kloroform:isoamyl alkol (24:1; sigma C0549) ilave edilir ve 10 dk çalkalanır.

4- Örnekler 10 dk 13.000 rpm'de santrifüjlenir.

5- Üstte kalan faz ayrı bir tüpe aktarılır. Altta kalan organik fazdır.

6- 300 µl kloroform:isoamyl alkol örneklere ilave edilir. Örnekler dikkatli bir şekilde 10 dk. boyunca çalkalanır.

7- Üstteki faz yeni bir tüpe aktarılır. Bu aktarma işlemi yapılırken organik fazdan almamaya dikkat edilmelidir. Eğer organik faz varsa 3dk santrifüjlenir ve kalan organik faz ayrılır.

8- 0.1 hacim (30 µl) 2M sodyum asetat pH:5.6 ve 1 ml buzlukta soğutulmuş etanol (%100) eklenir.

9- Örnekler birkaç kez ters düz edilir. Bu noktada DNA görülür

10- Eğer prosedüre ara verilmek isteniyorsa bu basamakta DNA -20 °C'de gece boyu ya da buz üstünde 30 dk bekletilebilir.

11- Örnekler 13.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenir.

12- Süpernatant dökülerek uzaklaştırılır. Çökelti 1 ml %70 alkolle yıkanır.

13- 13.000 rpm 'de 5 dk santrifüj yapılarak DNA'nın çökmesi sağlanır.

14- Alkol dökülerek uzaklaştırılır. Kalan süpernatant da uzaklaştırılır. Tüpler bir süre kurumaya bırakılır.

15- DNA pelleti 15-30 dk kurumaya bırakılır.

16- Tüpler kuru görüldüğünde 20 µl TE tamponu tüplerin dip kısmına eklenir.

17- 37 °C'de 30 dk inkübe ederek DNA'nın yeniden çözülmesi sağlanır.

18- Tüpler kısa süre için 4°C'de, 1-6 için -20 °C, daha uzun süreler içinse -70 °C'de saklanır.

2.2.6.1.1 Örneklerin Hazırlanması ve Kullanılan Solusyonlar

1M Tris-HCl (pH 8,0): 100 ml ultra pure (ultrapür) su içerisinde 12,11 gr Trizma base çözülür. pH'ı HCL ile ayarlanır. 4 °C'de koyu renkli şişe içerisinde 3 gün saklanır.

0.5 M EDTA (pH 8,0): 80 ml ultrapür su içerisinde 18.62 gr EDTA (Sigma E9884) çözülür. NaOH ile pH'ı ayarlanır. Daha sonra ultrapür su ile 100 ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

Homojenizasyon tamponu (pH 8.0): 100mM Tris HCl, 400 mM NaCl, 40 mM EDTA, %2 SDS. Oda ısısında saklanır.

TE tamponu (pH 8,0): 1 ml 1M Tris HCl'ye 0.2 ml 0.5M EDTA ilave edilir. Ultrapür su ile 100 ml'ye tamamlanır. 4 °C'de saklanır.

Kimyasallar steril olarak hazırlanmıştır. Ultrapür su, kullanılacak saklama şişeleri, otomatik pipet uçları ve endorff tüplerin kullanım öncesi otoklavda sterilizasyonu yapılmıştır.

DNA izolasyonunda kullanılan doku örnekleri aseptik koşullarda steril endorff tüplerde biriktirilmiş ve izolasyon adımı gerçekleştirilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.6.2 DNA Agaroz Jel elektroforezi

2.2.6.2.1 Agaroz Jelin hazırlanması ve kullanılan solusyonlar:

DNA'nın agaroz jel elektroforezini yapabilmek için %3'lük jel hazırlanmıştır.

Agaroz	→	1.8 gr
5X TBE tampon	→	3.5 ml
Su	→	20 ml

Hazırlanan jel solusyonu berraklaşmaya kadar mikrodalga fırında eritilmiştir. Berraklaştıktan sonra bir süre soğuması beklenmiş ve üzerine 6 µl etidyum bromide eklenip karıştırılmıştır. Bu karışım elektroforez tabağına dökülmüş; jel donduktan sonra içerisinde 1XTBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

5X TBE Tamponu: 54 gr Tris-base, 27,5 gr Borik asit, 20 ml Na EDTA karıştırılır. Ultrapür su ile 1000 ml'ye tamamlanır. pH 8.3'e ayarlanır.

2.2.6.2.2 Örneklerin hazırlanması ve kullanılan solusyonlar:

İzolasyon sonrasında $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan DNA örnekleri alınarak oda sıcaklığına getirilmiştir. Yükleme öncesinde 1:1 oranında yükleme solusyonu ile hazırlanmıştır.

%2'lik Bromfenol stok solusyonu: 0.2 gr bromfenol blue 10-15 ml'lik tüpe konur. Üzerine 10 ml ultrapür su eklenir. Boya eriyinceye kadar iyice karıştırılır. Koyu renkli şişe içerisinde, oda ısısında saklanabilir. Boya su içerisinde tamamen çözünmeyebilir. Bundan dolayı her kullanım öncesinde çalkalanmalıdır.

%2'lik Xylene cyanol stok solusyonu: 0.2 gr xylene cyanol (Sigma x4126) 10 ml ultrapür su içinde çözdürülür. Tamamen çözününceye kadar karıştırılır. Stok solusyon oda ısısında, koyu renkli şişe içerisinde saklanabilir. Suda tamamen çözünmeyebilir. Bundan dolayı her kullanım öncesinde çalkalanmalıdır.

%50'lik gliserol solusyonu: 10 ml gliserol üzerine 10 ml ultrapür su ilave edilir. İyice karıştırılır. Buzdolabında saklanır.

6X yükleme solusyonu: 6 ml %50 gliserol, 1 ml %2'lik brofenol solusyonu, 1ml %2'lik xylene cyanol solusyonu ve 2 ml ultrapür su karıştırılır. Hazırlanan solusyon buzdolabında saklanabilir. İçeriğinde bulunan gliserol ya da sükroz DNA'nın yoğunluğunu artırır. Böylece DNA kuyucuk içinde kolayca lokalize olur. İçeriğindeki boyalar elektroforez süresince DNA'nın aldığı yolu gösterir.

2.2.6.2.3 Örneklerin yüklenmesi ve elektroforez:

Hazırlanan örnekler ve standart (Sigma, D3812, DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp) mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işlemi bittikten sonra güç kaynağı açılmıştır. 100 volt'ta 45 dakika boyunca yürütme yapılmıştır. Jeller ultraviyole ışık altında analiz edilmiştir.

2.2.7. Histolojik İnceleme

Kontrol ve uygulama grubu ipekböceklerinin ipek bezlerinin anterior kısımları ışık mikroskobu seviyesinde histolojik yapılarının belirlenmesi amacıyla ele alınmıştır. Histolojik yönden incelenecek dokular Bouin fiksatif içerisinde 4 °C'de, 5-6 saat boyunca fiske edilmişlerdir. Rutin histolojik işlemler arasında şeffaflaştırma işlemi dokuların ksilolde çok kırılğan hale gelmesinden dolayı sedir yağı (Sigma, E9884) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Geri kalan kısımda rutin histolojik işlemler uygulanmıştır. Hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında alınan ipek bezinin anterior kısmına ait kesitler lisenli lam üzerine toplanmış ve Gills hematoksilen & Eosin Y ile boyanmışlardır. Kontrol grubu ve uygulama yapılan gruplara ait kesitler histolojik açıdan karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

2.2.7.1 Kullanılan boyalar:

Gills hematoksilen: 6 gr hematoksilen, 42 gr aluminyum sülfat, 1.4 gr sitrik asit, 1.0 gr sodyum iodat ve etilen glikol karıştırılır. 680 ml distile su ilave edilir. Tüm toz halindeki kimyasallar distile su içerisinde çözüldükten

sonra etilen glikol eklenir. Koyu renkli şişede, oda ısısında iki hafta boyunca olgunlaşması beklenir.

Eosin Y: 1 gr eosinY, 0.5 gr $K_2C_2O_7$, 10 ml sature pikrik asit, 10ml absolü alkol, 80 ml saf su karıştırılır ve kullanımda 1 ml glasiyal asetik asit karıştırılır. Koyu renkli şişede oda ısısında saklanır

2.2.8. İmmunohistokimya

İpekböceği (*Bombyx mori*) ipek bezinin anterior kısmından elde edilen kontrol ve uygulama yapılan gruplarına ait parafin kesitlerde ekdizon reseptör B1'in lokalizasyonu ve yoğunluğu immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir.

Kesitlerden parafinin giderilme işlemi ksilol kullanılarak, dokuları tekrar sulandırma işlemi ise azalan ethanol serileri ile gerçekleştirilmiştir. En son alkolden sonra kesitler 2dk distile su içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra dokularda membranın geçirgenliğini arttırmak için kesitler %2'lik Triton X-100 (Sigma; X100) solusyonu içerisinde 30 dk bekletilmiştir. Yüzey gerilimini azaltmak için %0.2'lik Tween 20 içeren solusyonda 20 dk bırakılmıştır. Daha sonra kesitler bloklama solusyonu içerisinde 25°C'de 30 dk bekletilerek proteinlerin maskelenmesi sağlanmıştır. Kesitler %1'lik normal keçi serumu içeren PBS ile 1:1000 oranında seyreltilen ekdizon reseptör B1 antibadisi (Iowa Üniversitesi, Hybridoma Bank, 9b9) ile 24-48 saat boyunca +4 °C'de inkübe edilmiştir. Negatif kontrol kesitleri ise içinde primer antibadi bulunmayan seyreltme solusyonunda aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kesitler 2x15 dk PBS pH 7.2 içerisinde yıkanmıştır. Var olması muhtemel endojen peroksidaz aktivitesini durdurmak

için % 0.3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2 ; Aldrich 32,338-1) nemli odacıkta bulunan kesitlere üstlerini örtecek kadar konularak 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra kesitler 3x15 dk PBS içerisinde yıkanmıştır. Kesitler nemli odacık içerisinde 1:200 oranında PBS ile seyreltilen sekonder antibadi (Anti-Mouse IgG (Fab specific)–Peroxidaz Antibadi, (Sigma A2304) ile 25 °C'de 2 saat boyunca inkübe edildikten sonra 2x15 dk PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Kromojen olarak 10mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma D5905) hazırlanmıştır. Kesitlere üstlerini örtecek kadar DAB ilave edilmiş ve reaksiyon mikroskop altında izlenmiştir. Kesitler akarsu altına alınarak reaksiyon durdurulmuştur. DAB sinyalini arttırmak için kesitler %4'lük bakır sülfat pentahidrat içerisinde 5 dk bekletilmişlerdir. Daha sonra akarsu altında yıkanmışlar ve kapatma öncesi rutin histolojik basamaklar uygulanmıştır; entallen ile kapatılarak mikroskopik incelemeleri yapılmış ve mikrofotografaları çekilmiştir.

DAB boyasının şiddetine göre EcR B1'in varlığı ve lokalizasyonu ile ilgili yorumlar yapılmıştır.

2.2.8.1 Kullanılan Solusyonlar ve Reaktifler

0.01M PBS (fosfatla tamponlanmış tuz solusyonu) (pH 7.2): 1.207 gr Na_2HPO_4 (Sigma, S7907) 0.204 gr KH_2PO_4 (Fluka 60219), 7.95 gr NaCl (Sigma, S9888) ve 0.202 gr KCl (Sigma, P9333) 1000 ml distile su içerisinde çözdürülür. pH'ı 7.2' ye ayarlanır.

%2'lik Triton X-100 Solusyonu: 2 ml triton X-100(Sigma X100), 98 ml 0.01M PBS'ye eklenir. Oda ısısında saklanır.

%0,2'lik Tween 20 Solusyonu: 0,2 ml Tween 20, 99,8 ml 0.01M PBS'ye eklenir. Oda ısısında saklanır.

Normal keçi serumu bloklama solusyonu: %2'lik normal keçi serumu (Sigma G9023), %1 BSA (Bovine serum albumin=sığır serum albumin) (Sigma A7906), %0.1 Triton X-100 (Sigma X100), %0.05 Tween 20, %0.05 sodyum azid 0.01 M PBS içerisinde hazırlanır. Karıştırılır. 4 °C'de saklanır.

Primer antibadi seyreltme solusyonu: %1 keçi serumu,%0.05 sodyum azid 0.01M PBS içinde hazırlanır. Hazırlanan solusyon 4 °C'de saklanır.

Sekonder antibadi seyreltme solusyonu: %0.05 Thimerosal, 0.01M PBS içinde hazırlanır. Hazırlanan solusyon 4 °C'de saklanır.

3,3'-diaminobenzidine (DAB) solusyonu: 10 mg DAB tableti (Sigma D5905), 10 ml 0.01M PBS içinde çözündürülür. Daha sonra Whatman No:1 ile filtre edilir. Hazırlanan solusyon koyu renkli şişe içerisinde 4 °C'de saklanır.

%4'lük Bakır Sülfat Pentahidrat Solusyonu: 4 gr bakır sülfat pentahidrat, 100 ml saf su içerisinde çözündürülür. Hazırlanan solusyon oda ısısında 1 ay saklanabilir.

3. BULGULAR

3.1 Uygulama Yapılan Gruplarda 5. Larval Evrede Görülen Değişimler

Kontrol grubu ipek böceklerinde 5. larval evrenin 7. gününde hayvanlar örme davranışı göstermeye başlamışlardır. Örme safhası 3 gün sürmüştür. 5. larval evrenin 10. gününde larval-pupal deri değişimi gerçekleşmiştir. Hayvanların tümü normal olarak pupalaşmışlardır.

0. günde 1 ng fenoxycarb uygulaması yapılan grupta 5. larval evrenin 7. gününe kadar kontrolden herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Ancak, hayvanlar 12. güne kadar beslenme periyoduna devam edilmiş ve 12. günde hayvanların %92'si örme davranışı içerisine girmişlerdir. Örme davranışı gösteren hayvanların %22'si koza örme sırasında ölmüşlerdir. Hayvanların ancak %38'i normal larval-pupal deri değişimi göstermişler; geri kalan %32'si larval pupal deri değişimi sırasında ölmüştür (Çizelge 1).

0. günde 10 ng, 3. günde 1 ve 10 ng uygulama yapılan grupların 5. larval evrenin 7. gününe kadar kontrol grubundan herhangi bir farklılığı yoktur. Ancak çizelge 1'de de görüldüğü gibi bu hayvanlar hiç bir zaman örme davranışı göstermemişler ve larval karakterlerini korumuşlardır. Bizim çalışmamızda bu grup hayvanlar 5. larval evrenin 20. gününe kadar yaşamışlardır.

6. günde yapılan 1 ng ve 10 ng fenoxycarb uygulaması sonrasında bu hayvanlarda kontrol grubundan herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Bu uygulama grubu ipekböcekleri 7. günde örme davranışı göstermişlerdir. 10. günde 1 ng fenoxycarb uygulaması yapılan hayvanların %73'ü, 10 ng

uygulanan hayvanların ise %62'si normal olarak larval-pupal deri değişimi göstermişlerdir(Çizelge3.1).

Çizelge 3.1. *Bombyx mori* larvasında örme davranışı ve pupalaşma üzerine fenoxycarb'ın etkisi

Uygulama Zamanı	% Örme Davranışı (% Pupalaşma) Doz/larva		
	0	1 NG	10 NG
0. GÜN	%99 (%98)	%92 (%38)	%2 (0)
3. GÜN	%100 (% 97)	0 *	0*
6. GÜN	%99 (%96)	%98 (%73)	%92 (%61)

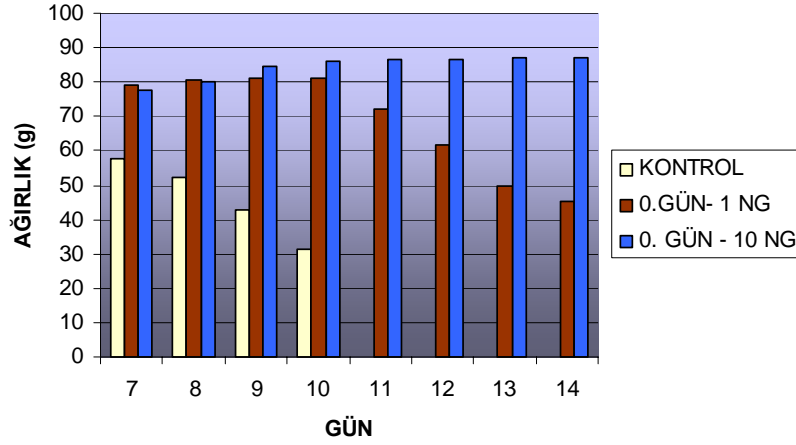
N= 150. * Uygulama yapılan larvalar kalıcı larva (dauer larva) durumunu göstermişlerdir.

3.1.1 Total Vücut Ağırlıkları

Kontrol ve uygulama gruplarındaki ipek böceklerinin total vücut ağırlıkları 7. günden pupa safhasına geçene kadar; pupa safhasına geçemeyen böceklerde ise 7. günden 14. güne kadar ölçülmüştür. Elde edilen günlük ağırlık ortalamaları şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'de verilmiştir.

Kontrol grubunda bulunan hayvanların total vücut ağırlıklarında 7. günde örme safhasının başlamasıyla birlikte larva-pupa deri değişimi gerçekleşene kadar düzenli bir düşüş belirlenmiştir.

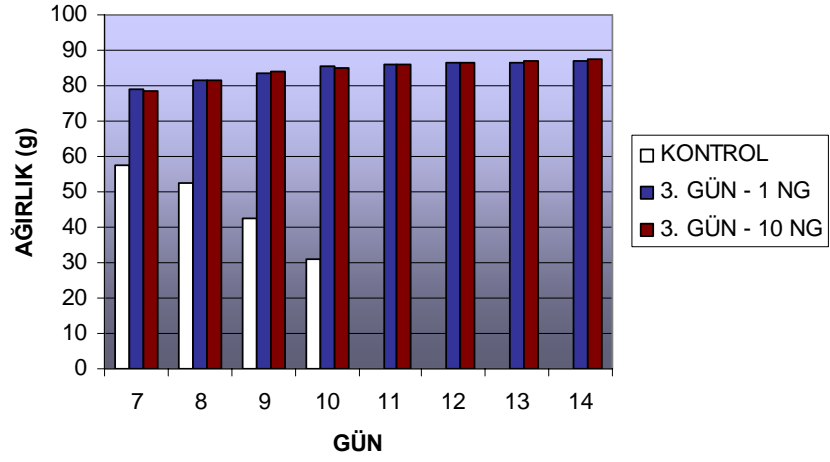
0. günde 1 ng uygulama yapılan hayvanlarda total vücut ağırlığı 5. larval evrenin 11. gününe kadar artmaya devam etmiştir. 11. günde hayvanlar beslenme periyodunu kesmişlerdir. Bu hayvanlarda kontrol grubundan 5 gün daha geç gerçekleşen örme davranışının 12. günde başlamasıyla 14. güne kadar hayvanların vücut ağırlıklarının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 0. günde yapılan fenoxycarb uygulamalarının total vücut ağırlık artışına etkisinin kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak gösterilmesi. n=10

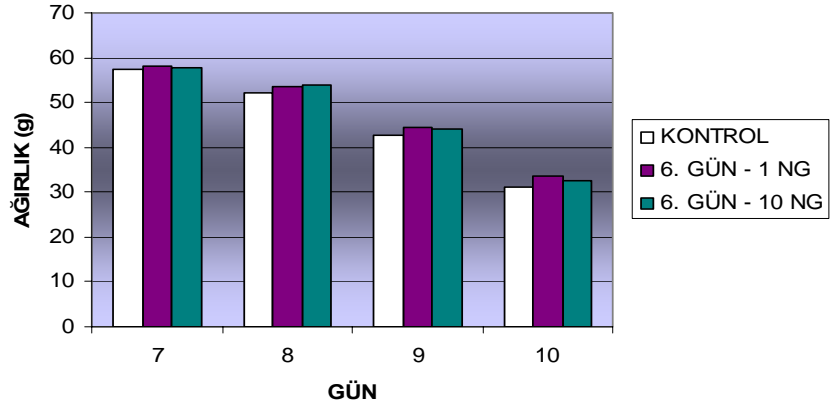
0. günde 10 ng uygulama yapılan grupta hayvanlar 7. günde örme davranışına girmediklerinden dolayı beslenme periyoduna devam etmişlerdir. Bunun sonucu olarak, total vücut ağırlığındaki artış devamlılık göstermiştir. Ancak, özellikle 11. günden itibaren ağırlıkta meydana gelen artışın miktarında düşüş olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1).

3. günde 1 ve 10 ng uygulama yapılan gruplar arasında total vücut ağırlığı açısından herhangi bir farklılık yoktur. Bu hayvanlar 0. günde 10 ng uygulama yapılan grupla benzer bir gelişim göstermiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 3. günde yapılan fenoxycarb uygulamalarının total vücut ağırlık artışına etkisinin kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak gösterilmesi. n=10

5. larval evrenin 6.gününde uygulama yapılan gruplar ile kontrol grubu arasında herhangi bir farklılık yoktur. Uygulama sonrasında total vücut ağırlığı açısından herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.3)



Şekil 3.3 6. günde yapılan fenoxycarb uygulamalarının total vücut ağırlık artışına etkisinin kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak gösterilmesi. n=10

3.2 Faz Kontrast Mikroskobu Bulguları

Kontrol grubu hayvanlarından 7. günden itibaren alınan ipek bezleri faz-kontrast mikroskobu altında morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

5. larval safhanın 7. ve 8. günlerinden alınan bezler birbirine benzerdir (Şekil 3.5a, 3.6a). Hücreler düzgün bir hat üzerinde dizilmişlerdir ve oldukça iyi ayırt edilir. Hücre sınırları da aynı şekilde gözlenebilir. Ancak herhangi bir hücrelerarası alan gözlenmemiştir. 9. günde hücreler nispeten saydamlığını kaybeder. Hücre sınırları çok açık bir şekilde gözlenir (3.7a). Hücre sınırlarının açıkça gözlenmesi hücrelerin birbirinden ayrılmaya başladığını gösteren bir işaret olabilir. Larva-pupa deri değişiminin gerçekleştiği 10.günde hücreler küçülür ve yuvarlaklaşırlar, nukleus bu safhada oldukça yoğun bir şekilde gözlenir. Hücrelerin birbirlerinden ayrılmaya başladıkları net bir şekilde ayırt edilir (Şekil 3.8a).

Pupalaşmanın 12. saatinde nuklear yoğunlaşma daha da ilerler ve bezin dış yüzeyi düzensiz bir hal alır. Hücrelerin birbirlerinden ayrıldıkları açıkça gözlenmektedir (Şekil 3.9a). 24. saat pupasında hücreler iyice yoğunlaşmıştır ve birbirlerinden tamamen ayrılmıştır (Şekil 3.10a). Pupalaşmanın 36. saatinde bezin içerisindeki yoğun yapılar kümelenmiş şekilde gözlenir (3.11a).

5.larval evrenin 0. gününde 1 ng fenoxycarb uygulama grubundan alınan ipek bezlerinin anterior kısımlarının faz kontrast mikroskobu incelemeleri sonucunda 7. günden 11. güne kadar hücresel yapının gayet iyi korunduğu gözlenmiştir (Şekil 3.12a, 3.13a, 3.14a, 3.15a). Hücreler şeffaftır. Herhangi bir yoğunlaşma ya da hücrelerin birbirlerinden ayrılmaya

başladıklarına ilişkin belirti yoktur. 11. günden itibaren hücrelerin sınırları ayırtılmaya başlamıştır (Şekil 3.16a). 12. günde hücresel içeriğin yoğunlaşmaya başladığı görülmektedir (Şekil 3.17a). 13. ve 14. günde hücre içindeki vakuoller belirgin hale gelmeye başlar (Şekil 3.18a, 3.19a).

0. günde 10 ng fenoxycarb uygulanan grupta da 7. günden 14. güne kadar herhangi bir farklılık belirlenmemiştir (Şekil 3.20a, 3.21a, 3.22a, 3.23a, 3.24a, 3.25a, 3.26a, 3.27a). Bu günler boyunca bez ve bezi oluşturan hücreler herhangi bir bozulma göstermeden sağlıklı bir şekilde kalmışlardır.

5. larval evrenin 3. gününde 1ng fenoxycarb uygulanan uygulama grubunda faz kontrast mikroskopuyla yapılan incelemelerde 7. günden 14. güne kadar bezin yapısında herhangi bir farklılık görülmemiştir (Şekil 3.28a, 3.29a, 3.30a, 3.31a, 3.32a, 3.33a, .34a, 3.35a).

3. günde 10 ng fenoxycarb uygulama grubunda da önceki iki uygulama grubunda olduğu gibi programlanmış hücre ölümüne ilişkin morfolojik özellikler belirlenmemiştir (Şekil 3.36a, 3.37a, 3.38a, 3.39a, 3.40a, 3.41a, 3.42a, 3.43a).

6. günde yapılan 1 ve 10 ng fenoxycarb uygulamaları sonrasında elde edilen faz kontrast mikroskopu incelemelerinde kontrol grubuyla aynı olduğu görülmektedir. 7. ve 8. günlerde hücrelerin sağlıklı oldukları görülmektedir (Şekil 3.44a, 3.45a; 3.51a, 3.52a). Hücreler saydamdır. 9. günden itibaren hücreler hücrelerarasındaki bağlantılar açıkça gözlenmektedir (Şekil 3.46a; 3.53a). Pupalaşmanın meydana geldiği 10. günde aynen kontrol grubunda olduğu gibi hücrelerde küçülme, hücre içeriğinde yoğunlaşma gözlenmektedir (Şekil 3.47a; 3.54a) . Pupal safhanın 12. saatinden itibaren hücrelerin birbirlerinden ayrılmaya başladıkları ve nuklear yapının

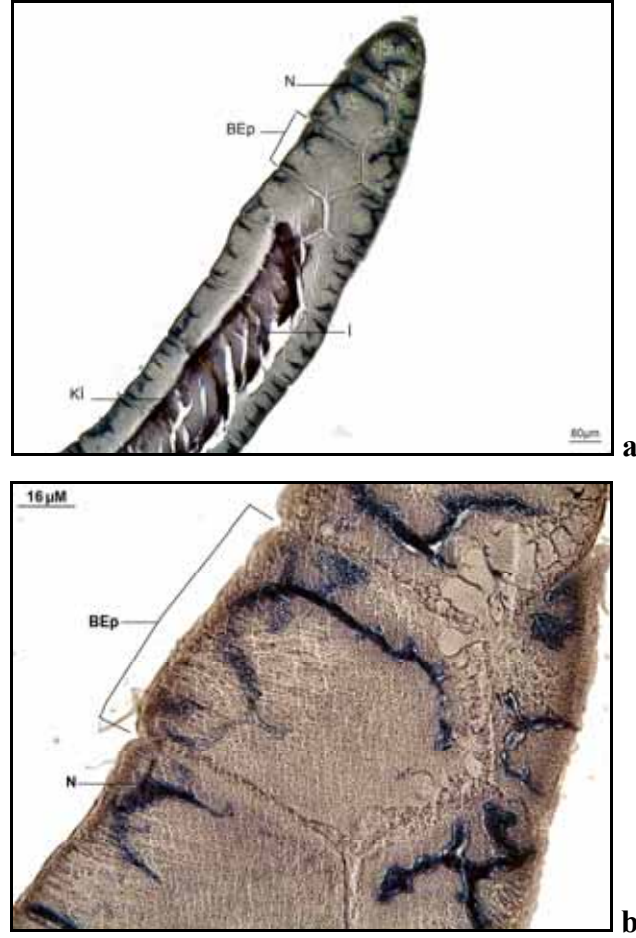
yoğunlaştığı belirlenmiştir (Şekil 3.48a; 3.55a). 24. saatten itibaren otofajik vakuoller belirginleşir (Şekil 3.49a; 3.56a) ve hücre sel yapıdaki dejenerasyonun 36. saate kadar hızlı bir şekilde ilerlediği gözlenmiştir (Şekil 3.50a; 3.57a).

3.3 Histolojik Bulgular

3.3.1 Kontrol Grubu

İpekböceği *Bombyx mori*'de anterior ipek bezi tek tabaka halinde dizilmiş, aynı tipte beşgen hücrelerden oluşan ince tüpsü bir kanaldır. Yaklaşık 0.5 mm çapına sahiptir. Hücrelerin apikal yüzeyi kütikula intima ile sınırlanmıştır. Bezin lümeni ise sıvı halde bulunan ipek ile doludur (Şekil 3.4a-b).

5. larval evrenin 7.gününde ipek bezinin anterior kısmından elde edilen histolojik kesitte hücreler düzgün bir hat üzerinde dizilmişlerdir. Hücrelerarası bağlantılar net bir şekilde ayırt edilmemektedir. Bu da hücrelerin birbirlerine sıkı bir şekilde bağlı olduklarını göstermektedir. Hücrelerin lümene bakan yüzeylerini döşeyen kütikula intima tabakası oldukça kalındır (Şekil 3.5b).



Şekil 3.4 İpekböceği *Bombyx mori*'de ipek bezinin anterior kısmının genel yapısı Hem&Eosin. **a)** 20X; **b)** 100X. Bez epiteli (BEp), İpek (İ), Kütikula İntima (Kİ), Nukleus (N).

8. gün ipek bezinin anterior kısmı 7. günden farklı değildir. Ancak hücrelerin apikal kısımlarından itibaren ayrılmaya başladıkları belirlenmiştir (Şekil 3.6b).

9. günde hücreler arasındaki bağlantılarda zayıflama dikkat çekmektedir. Programlanmış hücre ölümünde görülen bu tipik görünüm ipek

bezinin anterior kısmında da belirlenmiştir. Kütikula intima ile hücreler arasındaki bağlantıda da zayıflama görülmektedir (Şekil 3.7b).

10. günde larval-pupal deri değişimi meydana gelir. Bu günde hücrelerde küçülme meydana gelmiştir. Bu küçülme programlanmış hücre ölümünde hücrenin sıvı kaybetmesinde dolayı küçülmesi ve yoğunlaşması olarak düşünülmektedir. Aynı zamanda sitoplazmada az da olsa vakuol yapıları belirlenmiştir (Şekil 3.8b).

Pupalaşmanın başlamasından itibaren ipek bezinin anterior kısmında programlanmış hücre ölümü hızlı bir şekilde ilerler. Pupanın 12. saatinde hücrelerin iyice küçüldüğü, hücre içeriğinin yoğunlaştığı ve nukleuslarda genişlemenin olduğu belirlenmiştir. Nukleuslar hücrelerin bazal kısmında yerleşim gösterirler (Şekil 3.9b). Hücrelerin dış hattı oldukça düzensiz bir hal almıştır. 24. saatte hücrelerde dejenerasyon oldukça ilerlemiştir. Hücreler tek tek ayırt edilemezler. Hücresel yapıların içerisinde bol miktarda otofajik vakuol izlenmektedir. Özellikle apikal bölgede dejenerasyonun son derece belirgin olduğu görülmektedir. Hücreler oldukça küçülmüştür. Nukleuslar da küçülmüş, yassılaştı ve hücrelerin bazal tarafına çekilmiştir (Şekil 3.10b). 36. saatte hücresel içerik içerisinde yer yer nukleus yapıları belirlenmiştir. Bezin iç ve dış yüzeyi oldukça düzensizleşmiş ve dejenerasyon oldukça ilerlemiştir. Bez incelmıştır ve kütikula intima görülmemektedir (Şekil 3.11b).

3.3.2 (0. günde 1ng) Fenoxycarb Uygulama grubu

Bombyx mori'de 5. larval evrenin 0.gününde 1 ng fenoxycarb uygulanan gruptan alınan ipek bezlerinin anterior kısımlarında 7, 8, 9 ve 10.

günde histolojik yapılarının benzer olduğu görülmüştür. Bez epiteli hücreleri düzgün bir hat üzerine dizilmişlerdir. Hücresel boyutlara ilişkin herhangi bir farklılık yoktur. Hücresel arası sınırlar izlenmektedir. Ancak bu sınırlar arasında herhangi bir ayrılma durumu göze çarpmamaktadır (Şekil 3.12b, 3.13b, 3.14b, 3.15b).

11. günden itibaren hücreler arası alan belirgin hale gelmeye başlar (Şekil 3.16b). Hayvanların koza örme davranışı gösterdiği 12. günde hücre içerisinde otofajik vakuol oldukları düşünülen yapılar göze çarpar (Şekil 3.17b). 13. günde hücrelerin nukleusları oldukça küçülmüştür ve hücrelerin bazal kısmında yerleşim gösterirler. Hücre içerisinde otofajik vakuoller görülmektedir (Şekil 3.18b). 14. günde bu otofajik vakuollerin hücre içerisindeki miktarında ve büyüklüklerinde artış olduğu açıkça izlenmektedir (Şekil 3.19b).

3.3.3 (0. Günde 10ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu

Bombyx mori'de 5. larval evrenin 0. günde 10 ng fenoxycarb uygulanan hayvanların ipek bezlerinin anterior kısımlarında 7. günden 14. güne kadar belirgin bir değişiklik meydana gelmemektedir. Bu 7 günlük dönem boyunca hücresel yapı son derece iyi korunmuştur. Programlanmış hücre ölümüne ilişkin herhangi bir bulgu gözlenmemektedir (Şekil 3.20b, 3.21b, 3.22b, 3.23b, 3.24b, 3.25b, 3.26b). Günler arasında belirlenen en önemli farklılık özellikle 14. günde belirgin olarak gözlenen hücreler arası bölgede özellikle apikal alanda belirlenen hücrelerin birbirinden ayrılma noktalarıdır (Şekil 3.27b). Bunun dışında belirlenen herhangi bir farklılık yoktur.

3.3.4 (3. Günde 1 ve 10ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu

3. günde yapılan her iki uygulamada da ipek bezlerinin anterior kısımları histolojik olarak incelendiğinde günler arasında herhangi bir farklılık görülmemektedir. 3. günde 1 ng fenoxycarb uygulanan gruba ait 7. günden 14. güne kadar olan histolojik kesitler sırasıyla şekil 3.28b, 3.29b, 3.30b, 3.31b, 3.32b, 3.33b, 3.34b, 3.35b'de görülmektedir. Programlanmış hücre ölümüne ilişkin herhangi bir işaret yoktur. Hücresel yapı son derece belirgindir ve iyi korunmuştur. Benzer histolojik görünüm 3. günde 10 ng fenoxycarb uygulanan grupta da belirlenmiştir (Şekil3.36b, 3.37b, 3.38b, 3.39b, 3.40b, 3.41b, 3.42b, 3.43b).

3.3.5 (6. Günde 1 ve 10ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu

Bombyx mori'de 6. günde yapılan uygulamaların her ikisinde de histolojik açıdan elde edilen sonuçlar birbirine benzerdir ve kontrol grubuyla paralellik göstermektedir. 7. ve 8. günlerde bezin yapısı son derece korunmuş olarak görünürken (Şekil 3.44a, 3.45a; 3.51a, 3.52a) 9. günden itibaren hücrelerin birbirlerinden ayrılmaya başladıkları göze çarpmaktadır (Şekil 3.46a; 3.53a). Bu ayrılmanın apikal bölgede başlayıp bazala doğru ilerlediği belirlenmiştir. Larval pupal deri değişimi 10. günde meydana gelmiştir (Şekil 3.47a- 3.54a). Bu hayvanlar pupal safhaya geçtikleri için disseksiyon her 12 saatte bir yapılmıştır Pupal safhanın 12. saatinde hücrelerin içerisinde bol miktarda otofajik vakuol oluştuğu görülmektedir (Şekil 3.48a; 3.55). Pupanın 24. saatinde elde edilen sonuçlar kontrol grubundan farklı değildir (Şekil 3.49a – 3.56a). Pupal safhanın 36. saatinde bezdeki dejenerasyon son noktasına ulaşmıştır (Şekil 3.50a; 3.57a).

3.4 İmmunohistokimya Bulguları

3.4.1 Kontrol Grubu

Kontrol grubu ipekböceği 5. evre larvalarında ekdizon reseptör B1 immunohistokimyasal olarak 7. günde zayıf bir şekilde belirlenmiştir (Şekil 3.5c-d-e). Ancak özellikle 8. günden itibaren reseptör yoğunluğunda artış olduğu görülmüştür (Şekil 3.6c-d-e). Steroid hormon reseptörü olan ekdizon reseptör B1 (EcR B1) hücre nukleusunda yerleşim göstermektedir. Son reaksiyon ürünü olan diaminobenzidin (DAB)'in kahverengi renginden dolayı DAB pozitif olan hücreler EcR B1 reseptörüne sahip hücreler olarak kabul edilmiştir. 9. günde reseptör yoğunluğu en üst noktadadır (Şekil 3.7c-d-e). 10. günde yani pupalaşma anında DAB sinyalinin hücre nukleuslarında zayıfladığı belirlenmiştir (Şekil 3.8c-d-e). Pupanın 12. saatinden itibaren ve sonrasında EcR B1 artık hücre nukleuslarında belirlenemez duruma gelmiştir (Şekil 3.9c-d-e, 3.10c-d-e, 3.11c-d-e, 3.12c-d-e).

3.4.2. (0. Günde 1ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu

İpekböceği *Bombyx mori* 5. evre larvalarına 0. günde 1 ng fenoxycarb uygulaması kontrol grubuyla kıyaslandığında ekdizon reseptör B1'in hücre içerisinde ortaya çıkışı açısından oldukça farklılıkların doğmasına neden olmuştur. Bu grup hayvanların 7. günde hücre nukleusları içerisinde EcR B1 belirlenmemiştir (3.12c-d-e). 8. ve 9. günlerde hücre nukleusları içerisindeki DAB sinyalinin nispeten yüksek olmasından dolayı bu günlerde reseptör miktarında artış olduğu düşünülebilir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hemen hemen benzer sonuçlar olduğu görülmektedir (3.13c-d-e, 3.14c-d-e). 10. günde ise kontrol grubunun aksine reseptör nukleuslarda bulunmaktadır.

Ancak önceki 2 güne nazaran sinyalin nispeten az olduğu görülmektedir (3.15c-d-e). 11. ve 12. günlerde ise EcR B1 miktarında belirgin bir azalma olduğu DAB sinyaline bakılarak söylenebilir (3.16c-d-e, 3.17c-d-e). Bu günler hayvanın beslenme periyoduna son verdiği ve örme aktivitesine başladığı günler olarak düşünülürse kontrol grubuyla benzer bir sonuç olduğu ortaya çıkar. İlginç olarak 13. günde EcR B1 yoğunluğunda hızlı ve belirgin bir artış meydana gelmiştir. Hücre morfolojisinde de hızlı bir değişimin meydana geldiği görülmektedir. Bu günde küçülen ve hücrenin bazal kısmına çekilen nukleuslarda DAB sinyali oldukça kuvvetlidir. Bu da reseptörün bu günde hızlı bir şekilde hücrede arttığını göstermektedir (Şekil 3.18c-d-e). 14. günde ise hücre içerisinde bol miktarda otofajik vakuollerin oluşumunu takiben nukleuslarda dejenerasyonun ilerlemesi sonucu reseptör yoğunluğunda düşüş olduğu bulunmuştur (Şekil 3.19c-d-e).

3.4.3. (0. Günde 10ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu

İpekböceği *Bombyx mori*'de beşinci larval evrenin 0. gününde 10 ng fenoxycarb uygulanan grupta 7. günde ekdizon reseptör B1 (EcR B1) belirlenmemiştir (Şekil 3-20c-d-e). Ancak özellikle 8. ve 9. günlerde EcR B1 yoğun bir şekilde hücre nukleuslarında görülmektedir (Şekil 3.21c-d-e, 3.22c-d-e). 10. günden 14. güne kadar DAB sinyalindeki azalma reseptör miktarının da azaldığının göstergesidir (Şekil 3.23c-d-e, 3.24c-d-e, 3.25c-d-e, 3.26c-d-e). 14. günde nukleuslarda EcR B1 bulunmadığı açıkça görülmektedir (Şekil 3.27c-d-e).

3.4.4. (3. Günde 1ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu

3.günde 1 ng fenoxycarb uygulaması yapılan grupta, EcR B1 'in hücre nukluslarında ortaya çıkışında 7. günden 12. güne kadar herhangi bir farklılık görülmemektedir. Gerçekleştirilen immunohistokimyasal denemelerde EcR B1'in bu günlerde hücrede bulunmadığı görülmektedir (Şekil 3.28c-d-e, 3.29c-d-e, 3.30c-d-e,3.31c-d-e, 3.32c-d-e). Ancak 12. ve 13. günde yapılan immunohistokimyasal boyamalarda kesitlerin düşük yoğunlukta da olsa DAB pozitif oldukları görülmektedir (Şekil 3.33c-d-e, 3.34c-d-e). 14. günde hücrelerin DAB negatif oldukları yani bu günde hücrelerde EcR B1'in bulunmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.35c-d-e).

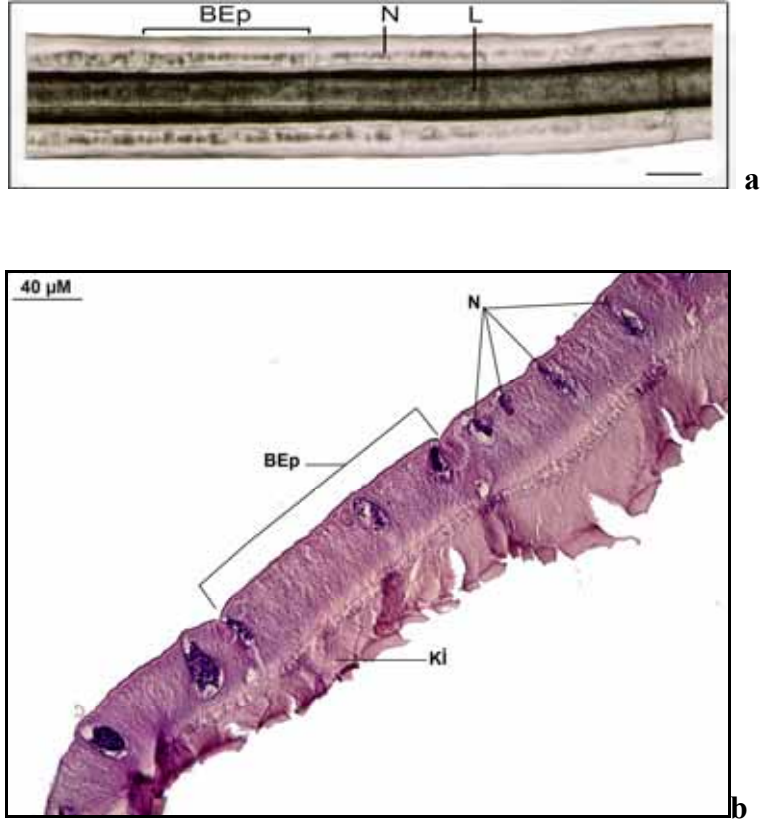
3.4.5 (3. Günde 10ng) Fenoxycarb Uygulama Grubu

Bu uygulama grubunda 7. güne ait olan bez hücrelerinde düşük yoğunlukta da olsa DAB sinyalinin var olduğu görülmektedir (Şekil 3.36c-d-e). Ancak bu sinyalin nispeten az olduğu düşünülürse burada EcR B1 olup olmadığı farklı yöntemler uygulanarak belirlenmelidir. 8. günden 14. güne kadar ise EcR B1 hücrelerde belirlenememiştir (3.37c-d-e, 3.38c-d-e, 3.39c-d-e, 3.40c-d-e, 3.41c-d-e, 3.42c-d-e, 3.43c-d-e).

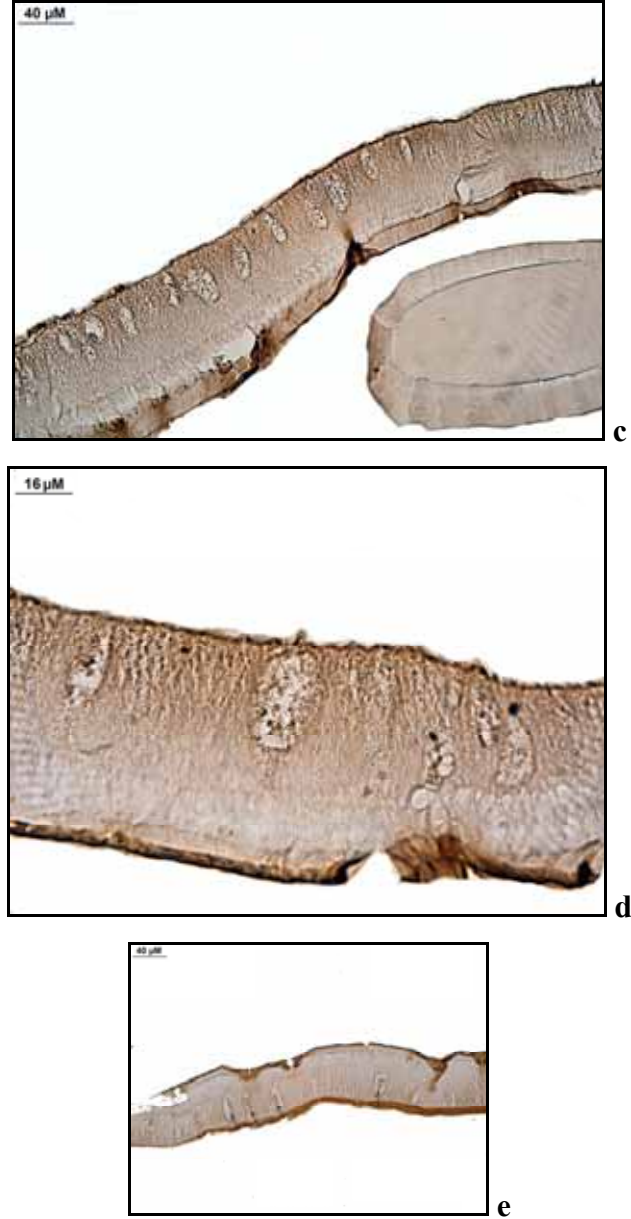
3.4.6. (6. Günde 1 ve 10ng Fenoxycarb Uygulama Grubu

Her iki uygulama grubunda EcR B1 7. günde az miktarda belirlenirken (Şekil 3.44c-d-e; 3.51c-d-e); 8. günden itibaren yoğun olarak gözlenmiştir (Şekil 3.45c-d-e, 3.52c-d-e). EcR B1'deki bu yoğunluk 10. güne yani pupalaşmaya kadar devam etmiştir (Şekil 3.46c-d-e, 3.47c-d-e; 3.53c-d-

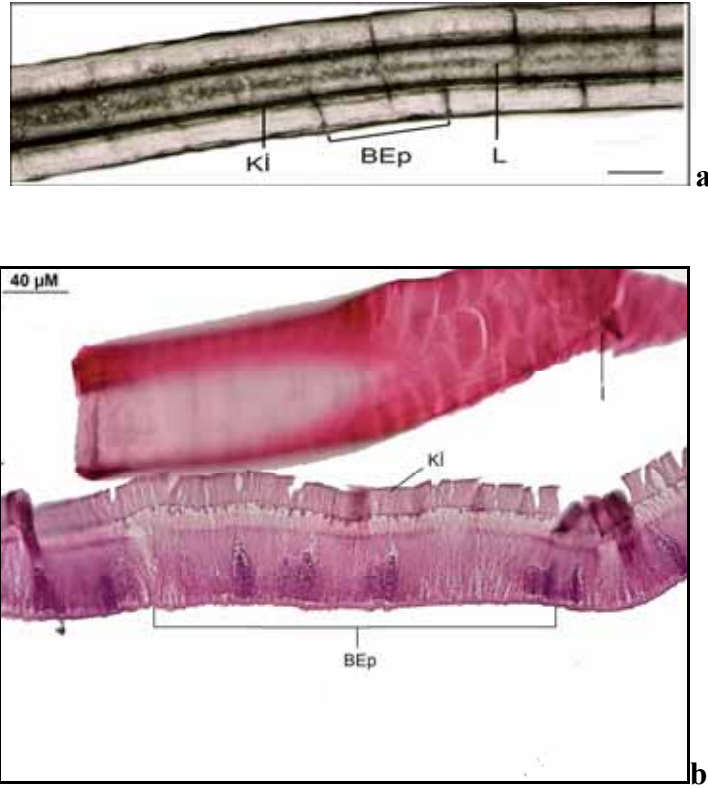
e, 3.54c-d-e). Bu uygulama grupları pupal safhaya geçtikleri için kontrol grubunda olduğu gibi pupal safhanın 12., 24., ve 36. saatlerinde immunohistokimyasal belirleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Pupal safhanın 12. saatinden 36. saatine kadar DAB sinyalindeki azalma EcR B1 yoğunluğundaki düşüşü göstermektedir (Şekil 3.47c-d-e, 3.48c-d-e, 3.49c-d-e, 3.50c-d-e; 3.55c-d-e, 3.56c-d-e, 3.57c-d-e)



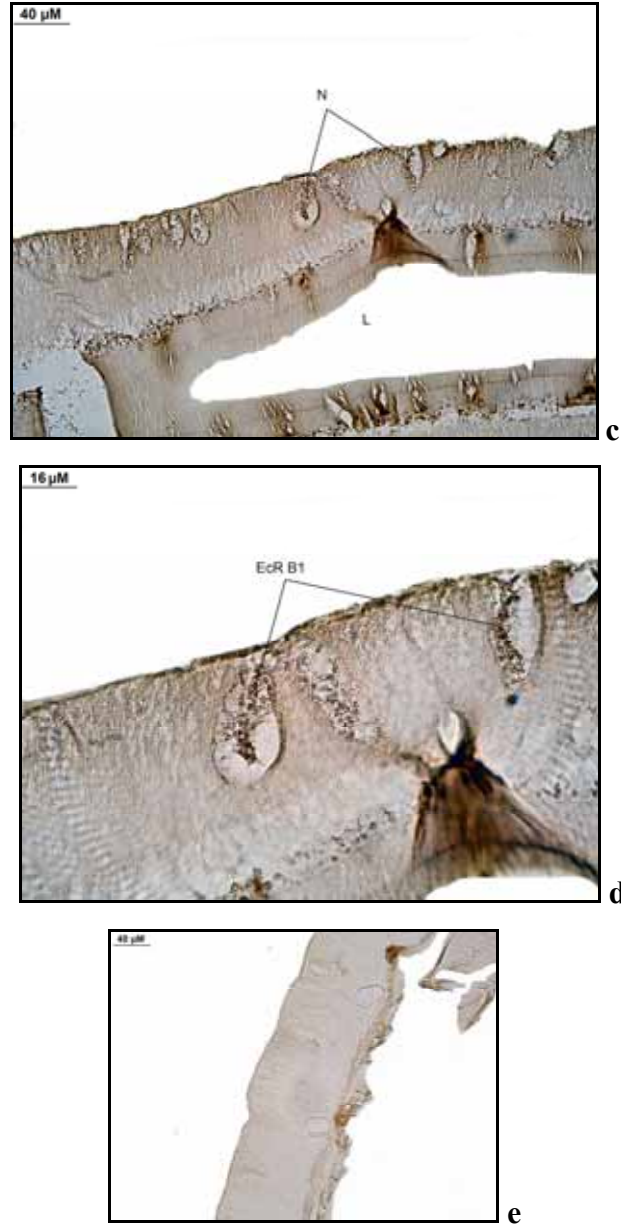
Şekil 3.5. Kontrol grubu *Bombyx mori* larvasında 5. larval evre 7. gün ipek bezi anterior kısmının. **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik Yapısı (Hem&Eosin) Bez epiteli (BEp), Kütikula İntima (Kİ), Lumen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



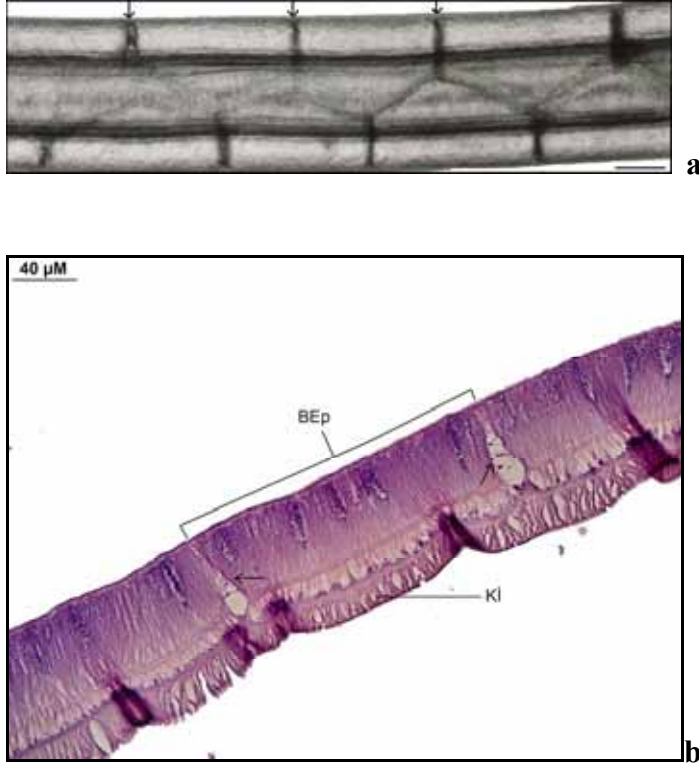
Şekil 3.5. Kontrol grubu *Bombyx mori* larvasında 5. larval evre 7. gün ipek bezi anterior kısmında; **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100 X; **e)** Negatif kontrol. Oklar nukleusu göstermektedir.



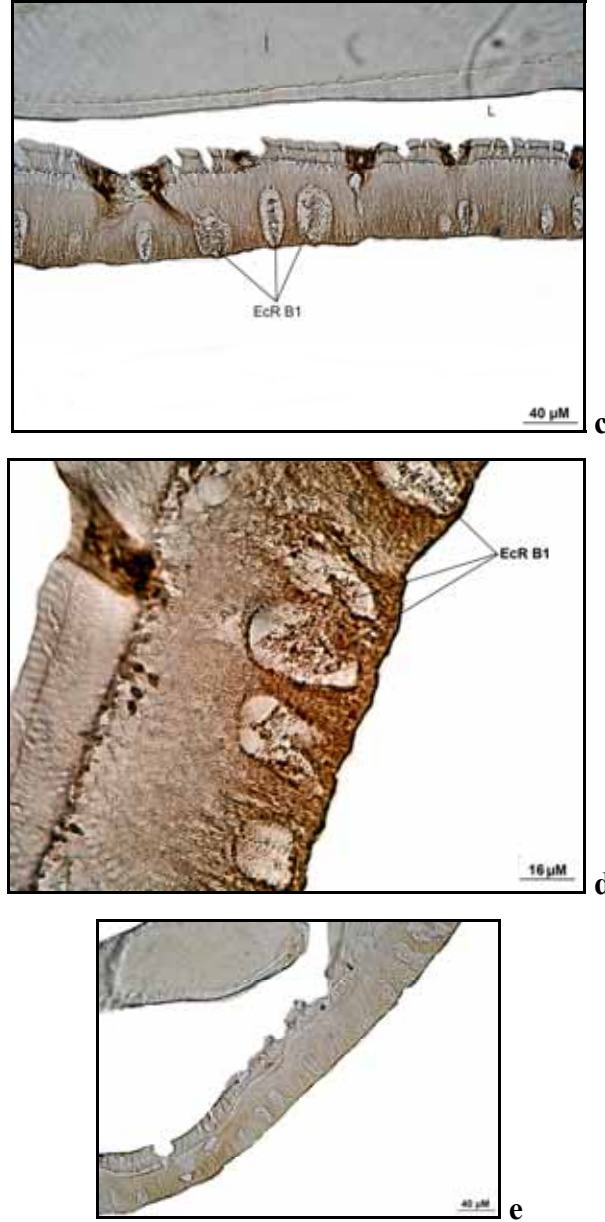
Şekil 3.6. Kontrol grubu *Bombyx mori* larvasında 5. larval evre 8. gün ipek bezi anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik Yapısı (Hem&Eosin) Bez epiteli (BEp), İpek (İ), Kütikula İntima (Kİ), Lümen (L), (a) için Skala bar 100 µm'dir



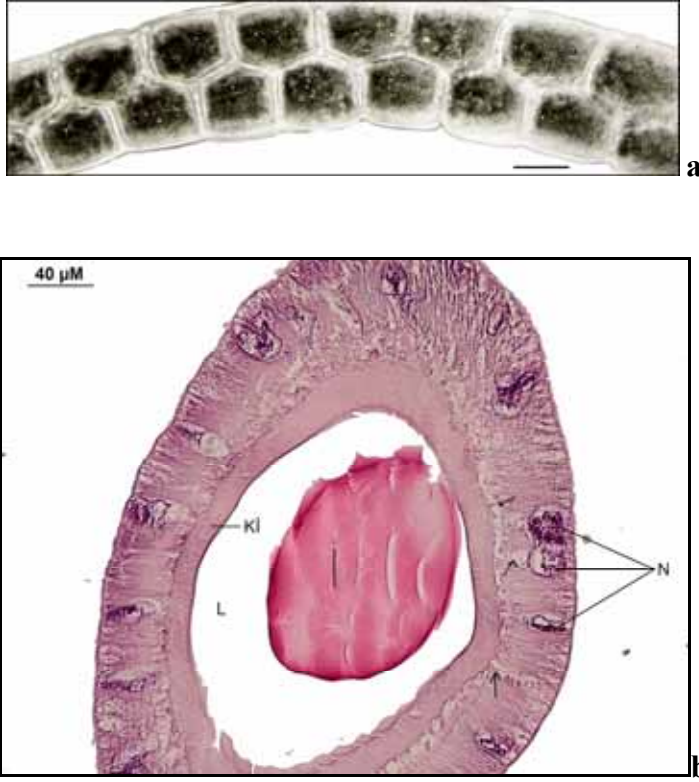
Şekil 3.6. Kontrol grubu *Bombyx mori* larvasında 5. larval evre 8. gün ipek bezi anterior kısmında; **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X ; **e)** Negatif kontrol. Ekdizon reseptör B1 (EcR B1), Nükleus (N).



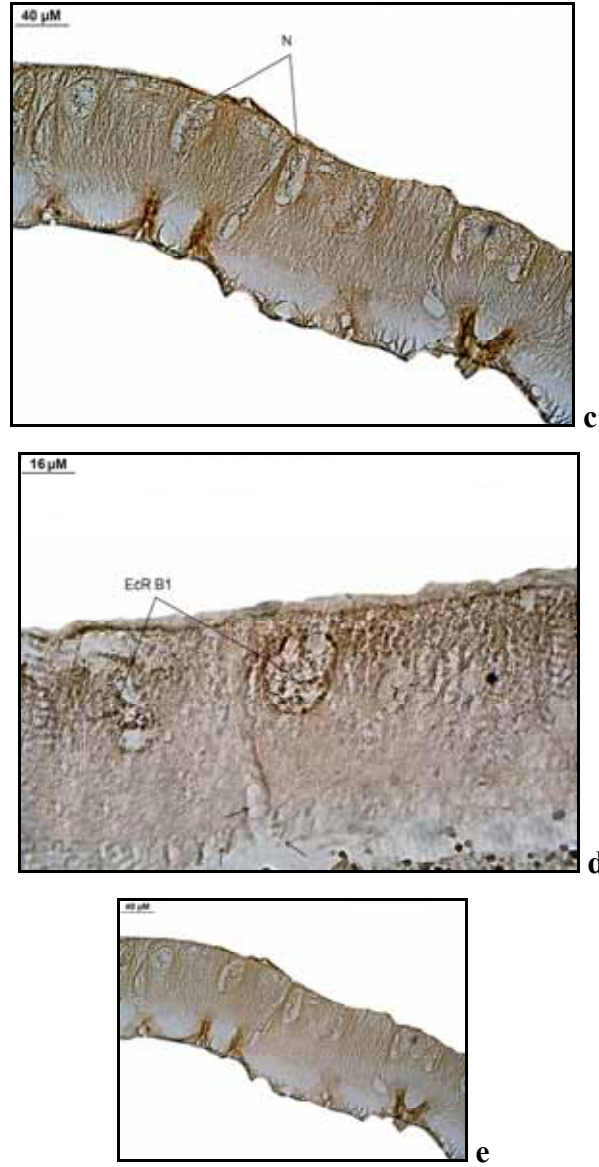
Şekil 3.7. Kontrol grubu *Bombyx mori* larvasında 5. larval evre 9. gün ipek bezi anterior kısmında **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik Yapısı (Hem& Eosin) Bez epiteli (BEp), Kütikula İntima (Kİ). Oklar hücreler arası bağlantılarda meydana gelen dejenerasyonu göstermektedir. (a) için Skala bar 100 μm'dir



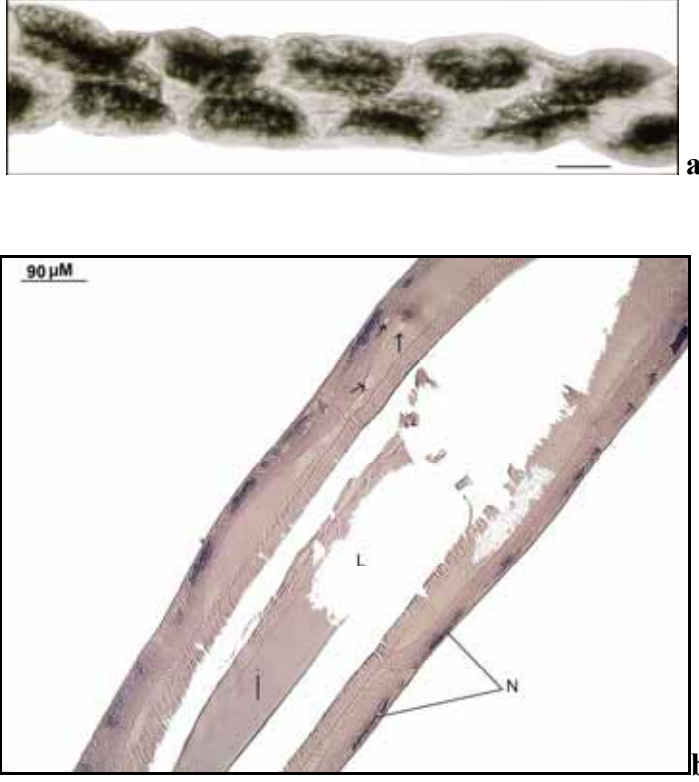
Şekil 3.7. Kontrol grubu *Bombyx mori* larvasında 5. larval evre 9. gün ipek bezi anterior kısmında; **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X). **d)** 100X, **e)** Negatif kontrol. Ekdizon Reseptör B1 (EcR B1), İpek (İ), Lümen (L).



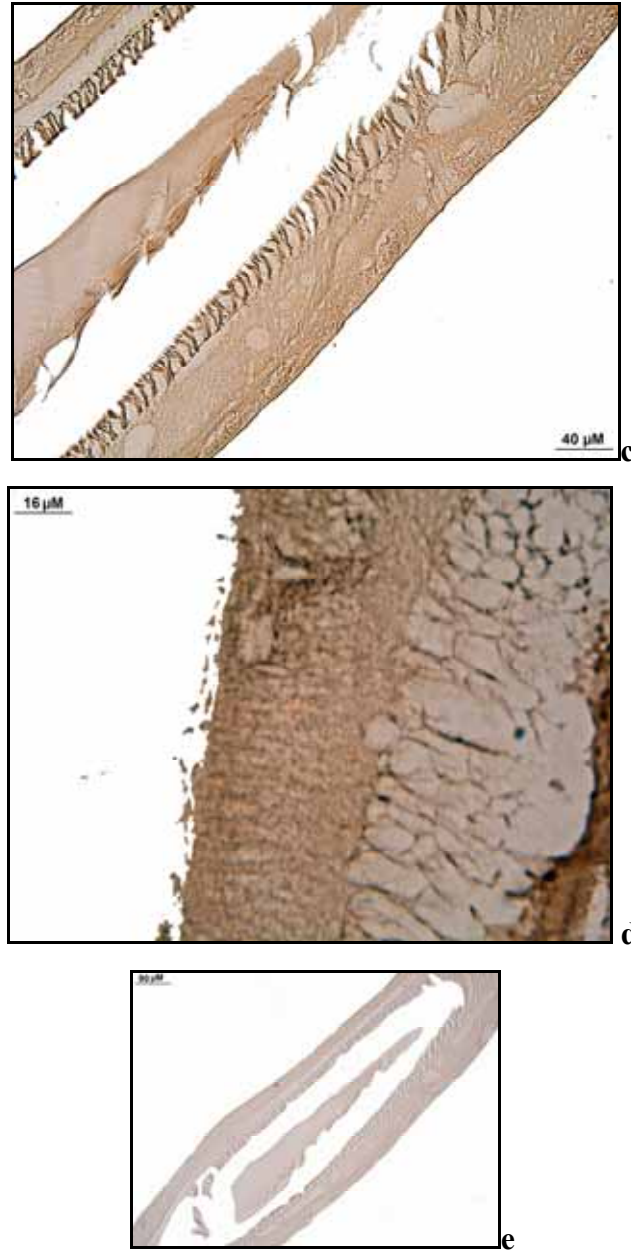
Şekil 3.8. Kontrol grubu *Bombyx mori*'de 10. gün (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmı **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik Yapısı (Hem&Eosin). İpek (İ), Kütikula İntima (Kİ), Lümen (L), Nukleus (N), Oklar membranda meydana gelen dejenerasyonu göstermektedir. (a) için Skala bar 100 µm'dir



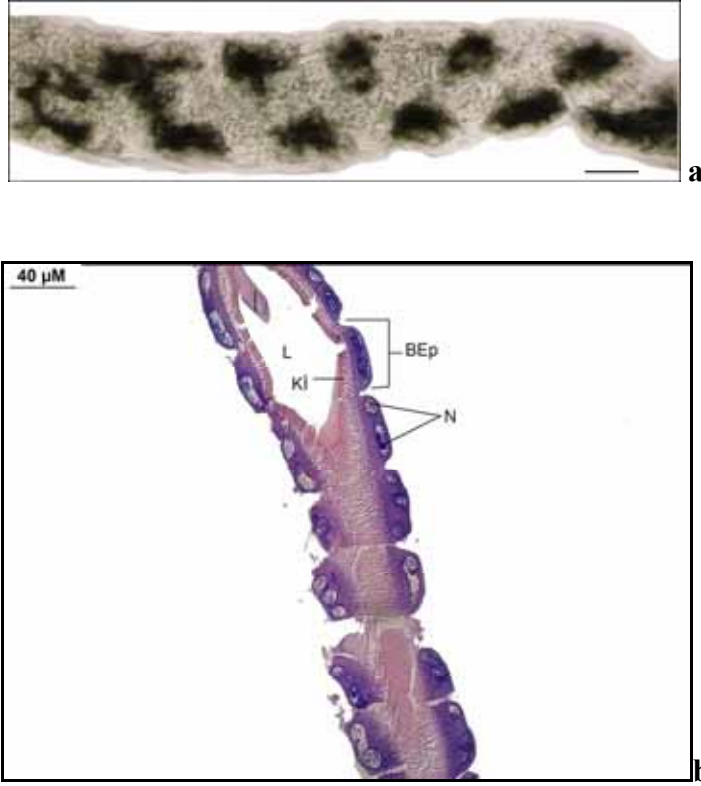
Şekil 3.8. Kontrol grubu *Bombyx mori* larvasında 5. larval evre 10. gün ipek bezinin anterior kısmı; **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol. Ekdizon Reseptör B1 (EcR B1), Nukleus (N). Oklar hücre membranlarının apikal bölgelerindeki dejenerasyonu göstermektedir.



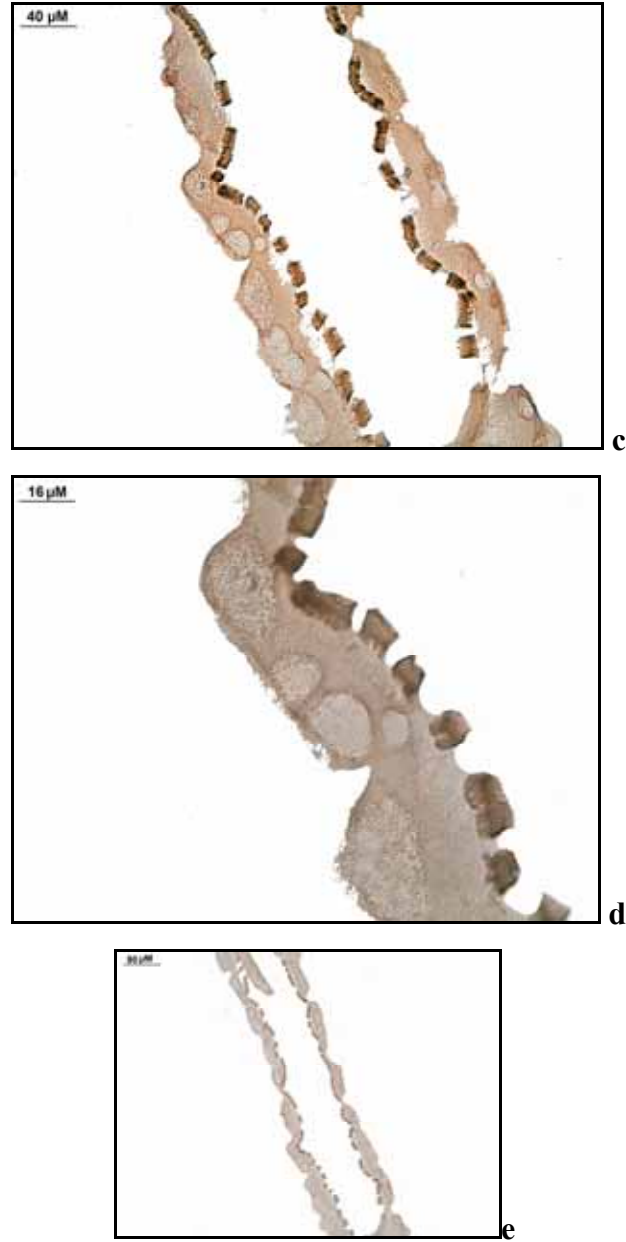
Şekil 3.9. Kontrol grubu *Bombyx mori* pupa 12. saat ipek bezinin anterior kısmı **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik Yapısı (Hem& Eosin), İpek (İ), Lümen (L), Nukleus (N). Oklar hücre içinde otofajik vakuolleri göstermektedir. (a) için Skala bar 100 μm 'dir



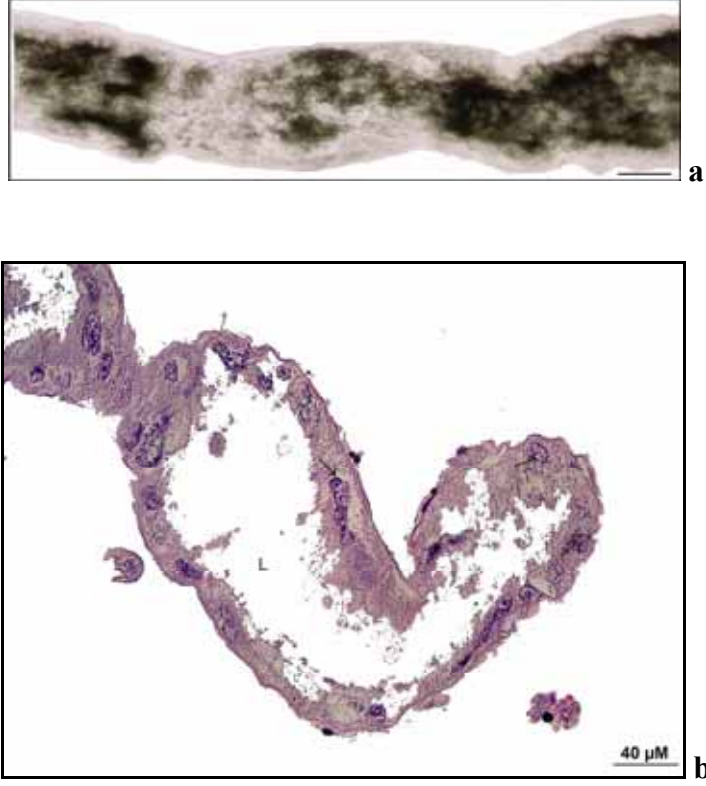
Şekil 3.9. Kontrol grubu *Bombyx mori* pupasında 12. saatte ipek bezinin anterior kısmında; **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100 x; **e)** Negatif kontrol.



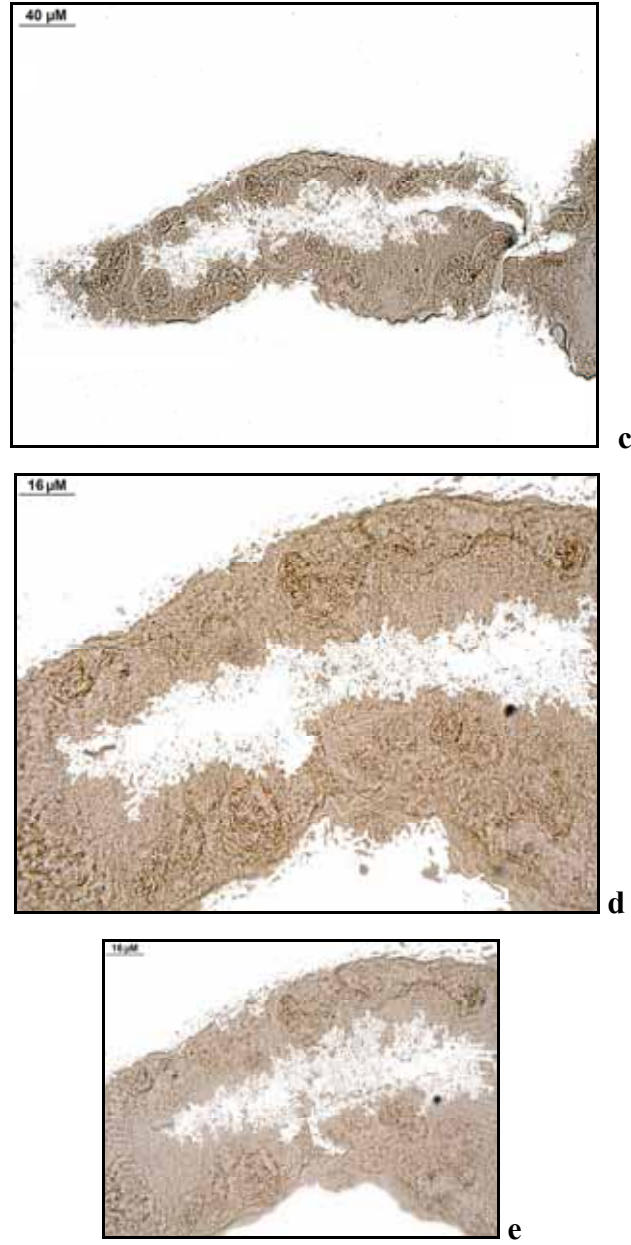
Şekil 3.10. Kontrol grubu *Bombyx mori* pupasında 24. saat ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü; **b)** Histolojik Yapısı (Hem) Bez epiteli (BEp), İpek (İ), Kütikula İntima (Kİ), Lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 85 μm 'dir



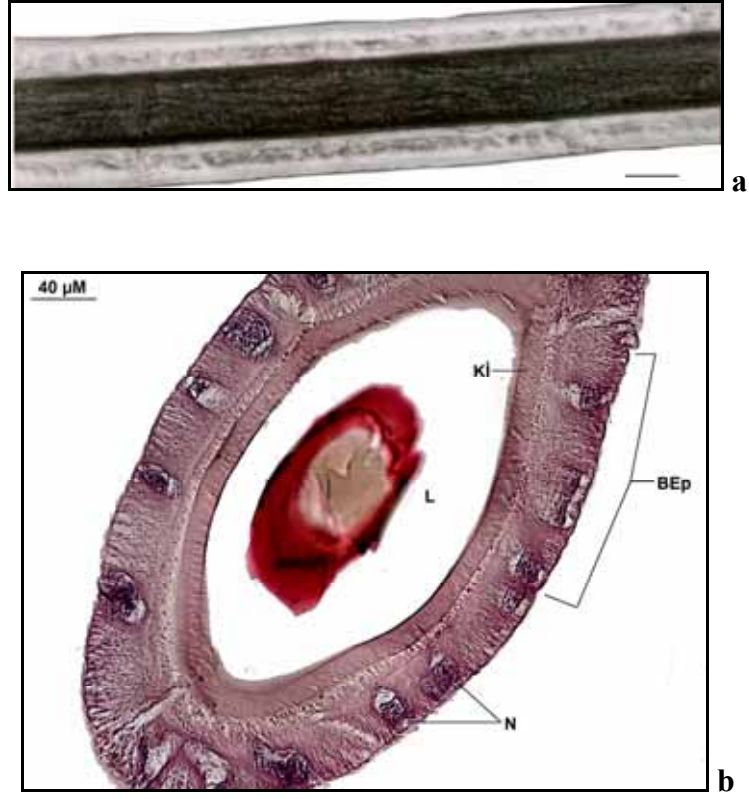
Şekil 3.10. Kontrol grubu *Bombyx mori* pupasında 24. saatte ipek bezinin anterior kısmında; **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



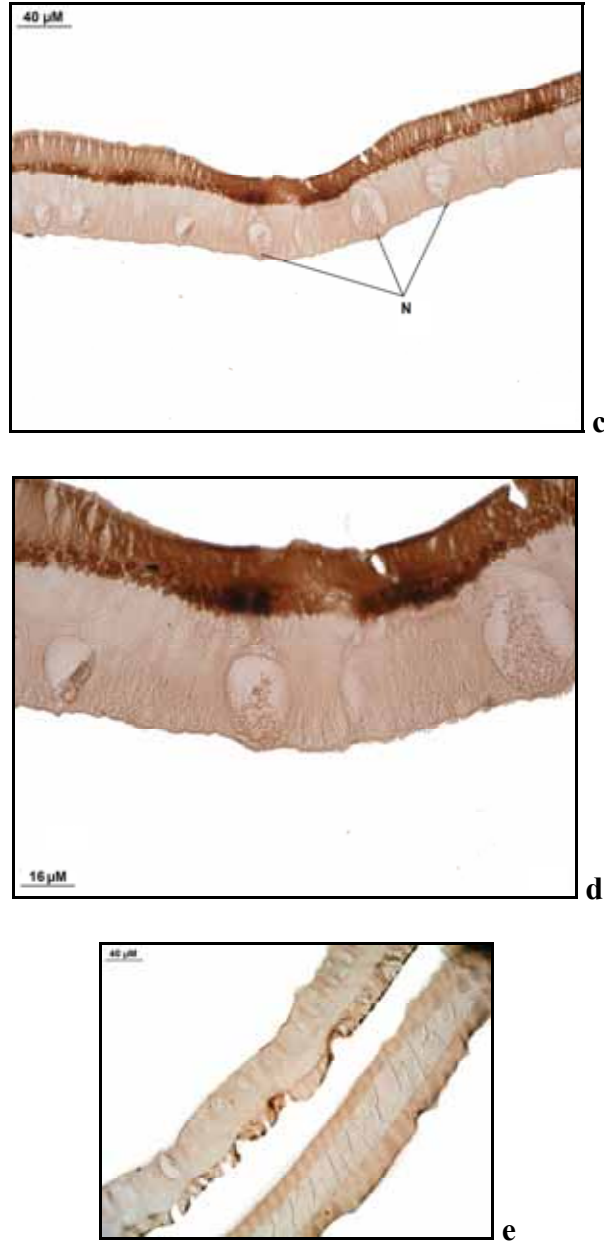
Şekil 3.11. Kontrol grubu *Bombyx mori* pupa 36. saatte ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik Yapısı (Hem&Eosin). Lümen (L). Oklar nukleuslardan kalan yapıları göstermektedir (a) için Skala bar 85 μm 'dir



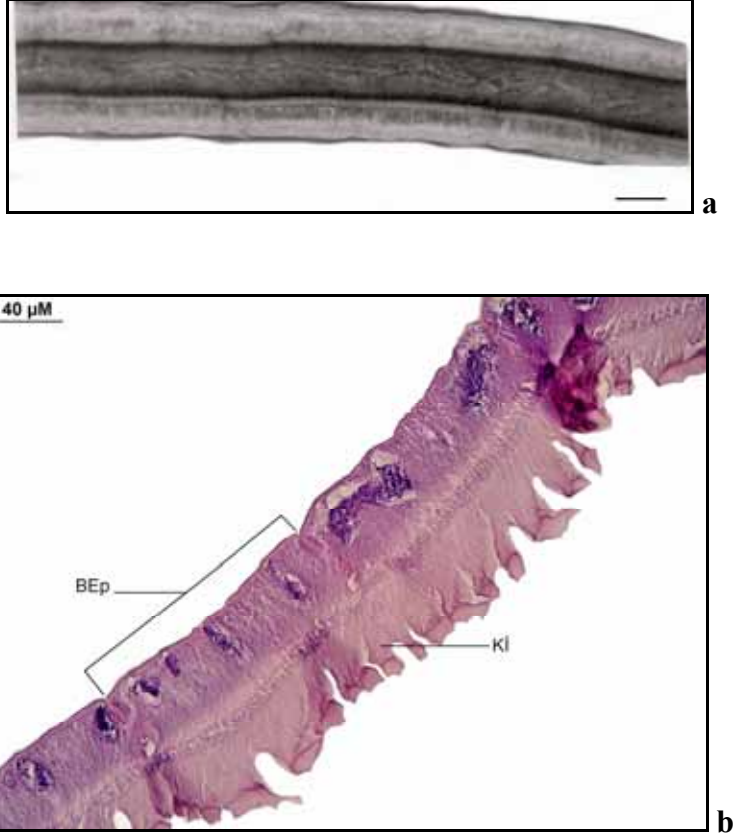
Şekil 3.11. Kontrol grubu *Bombyx mori* pupasında 36. saatte ipek bezinin anterior kısmında; **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X.; **e)** Negatif kontrol



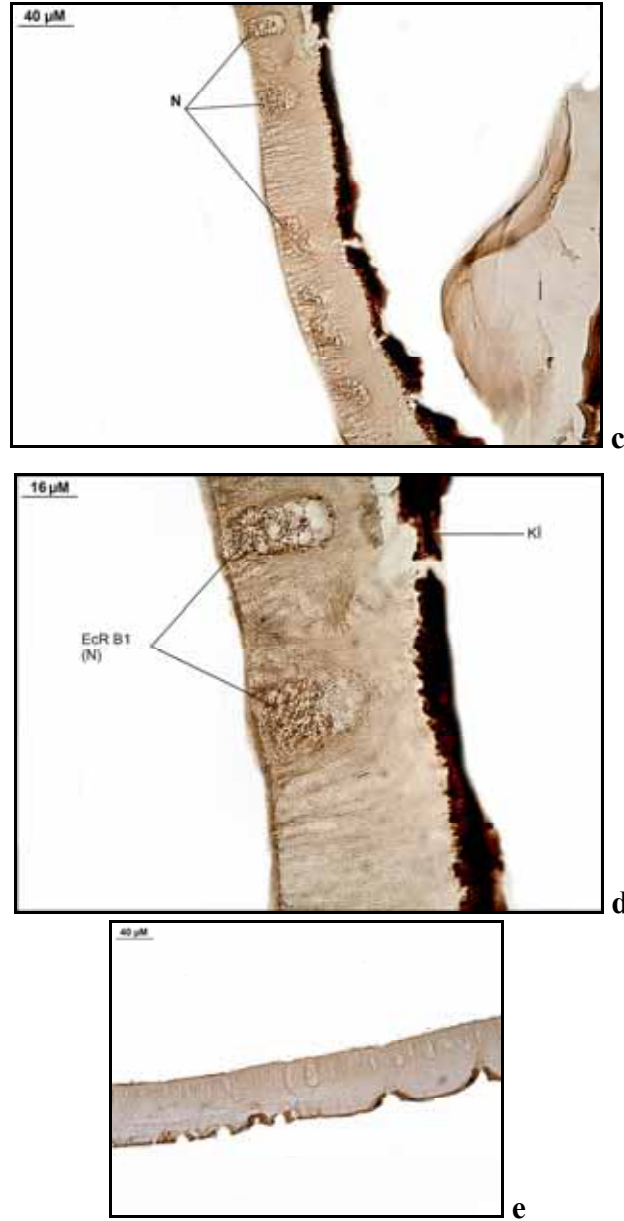
Şekil 3.12. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü; **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), İpek (İ), Lümen (L), Kütikula İntima (Kİ), Nukleus (N).(a) için Skala bar 100 µm'dir.



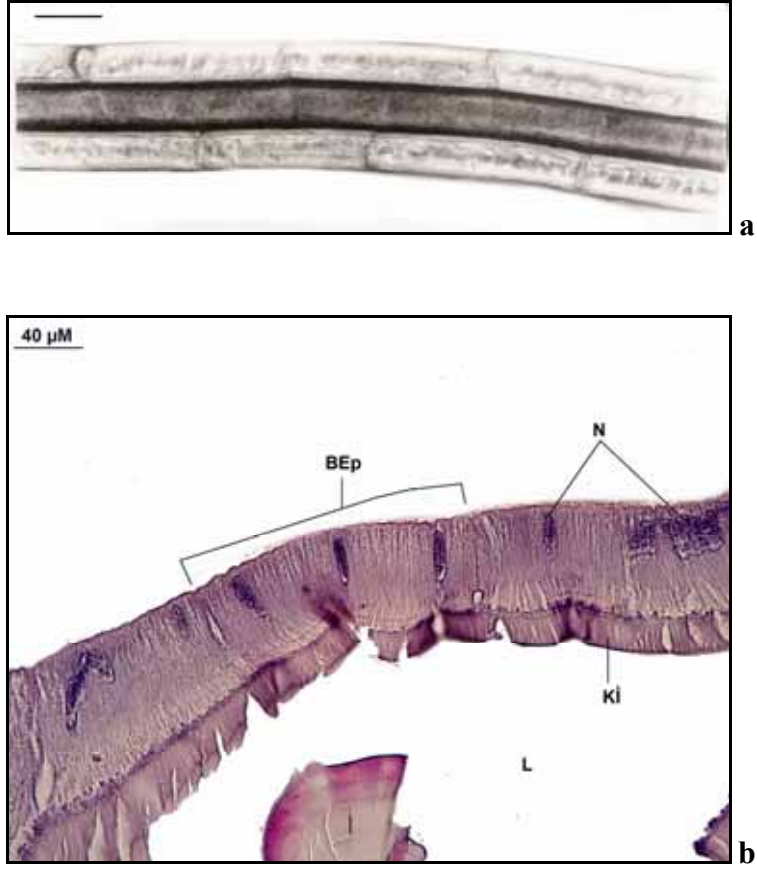
Şekil 3.12 0.gün-1ng uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif Kontrol. Nukleus (N)



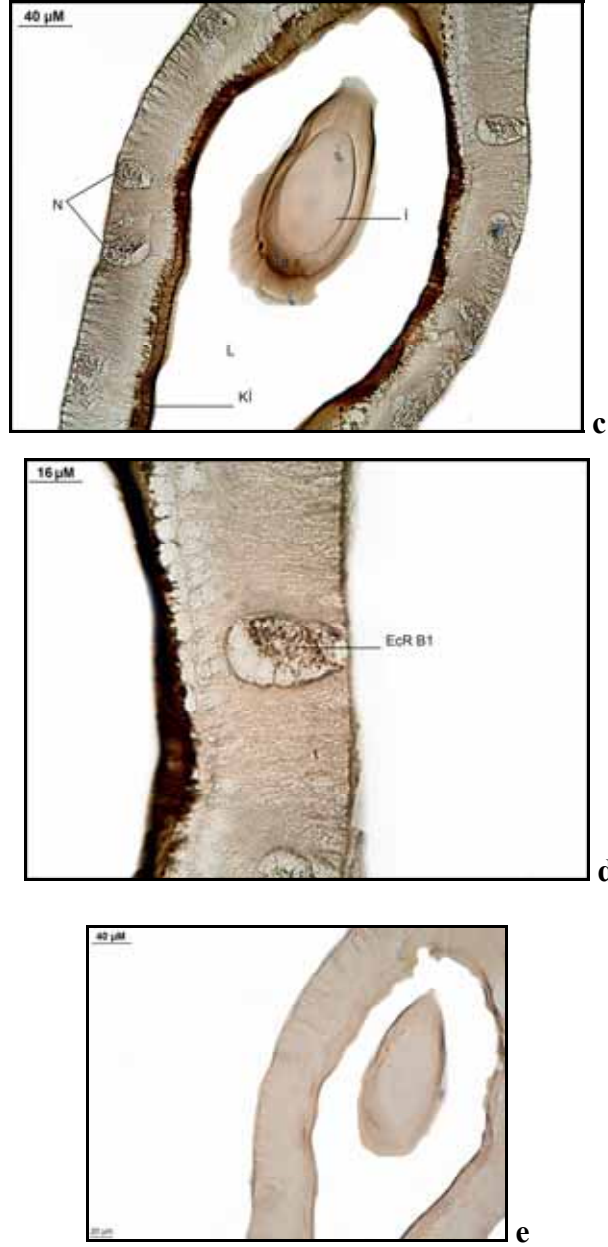
Şekil 3.13. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü; **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), Kütikula İntima (KI) (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



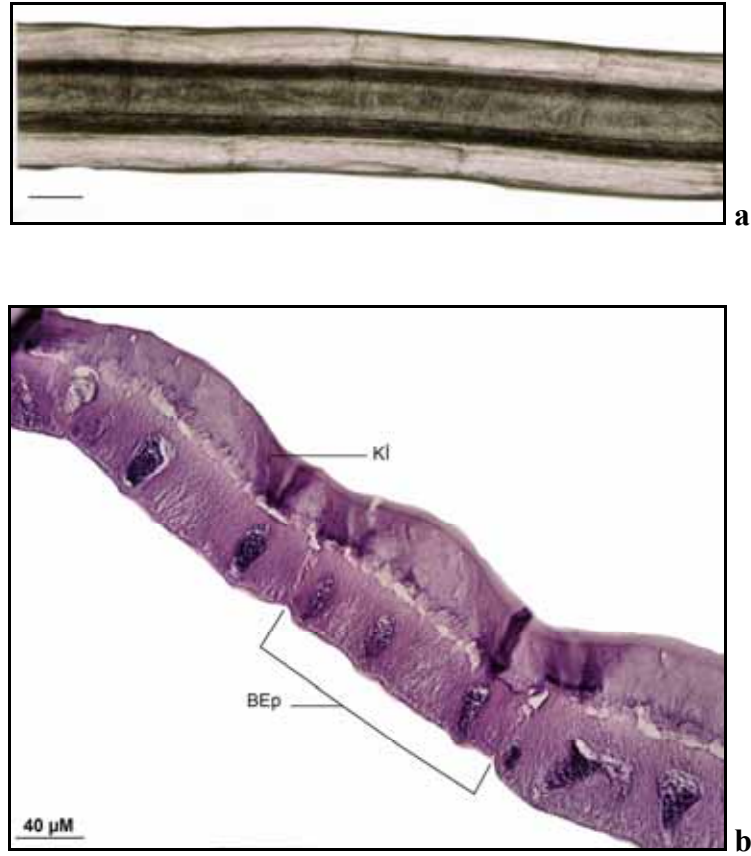
Şekil 3.13 (0.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40x). **d)** 100X, Ekdizon reseptör B1 (EcR B1), İpek (İ), Kütikula İntima (Kİ), Nucleus (N), **c)** Negatif kontrol



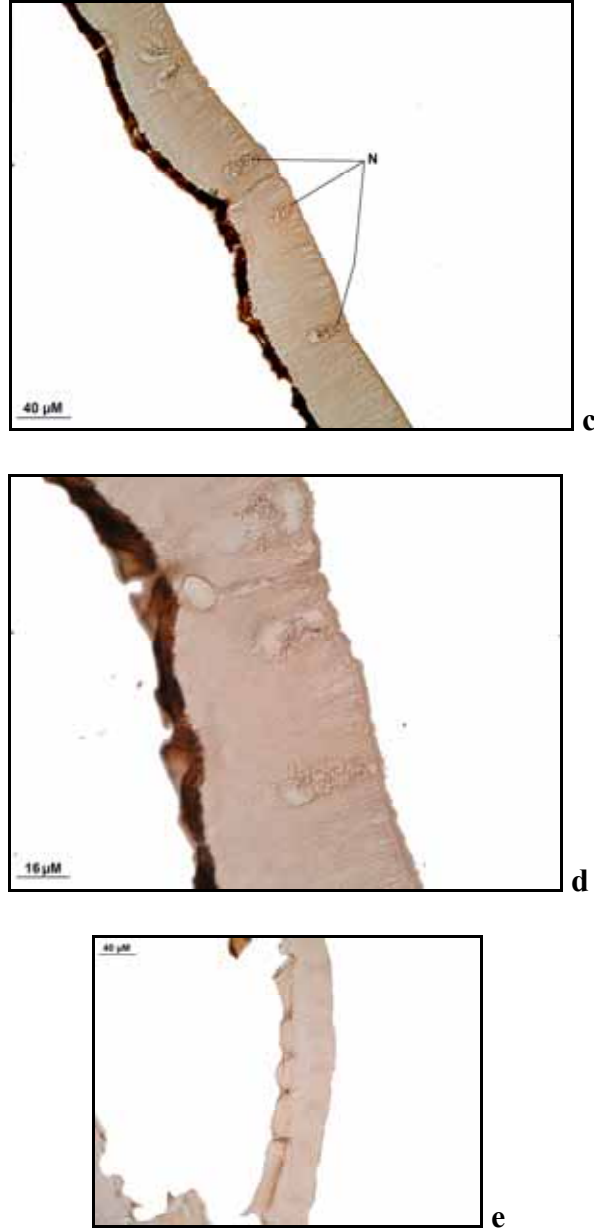
Şekil 3.14. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), İpek (İ), Lümen (L), Kütikula İntima (KI), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



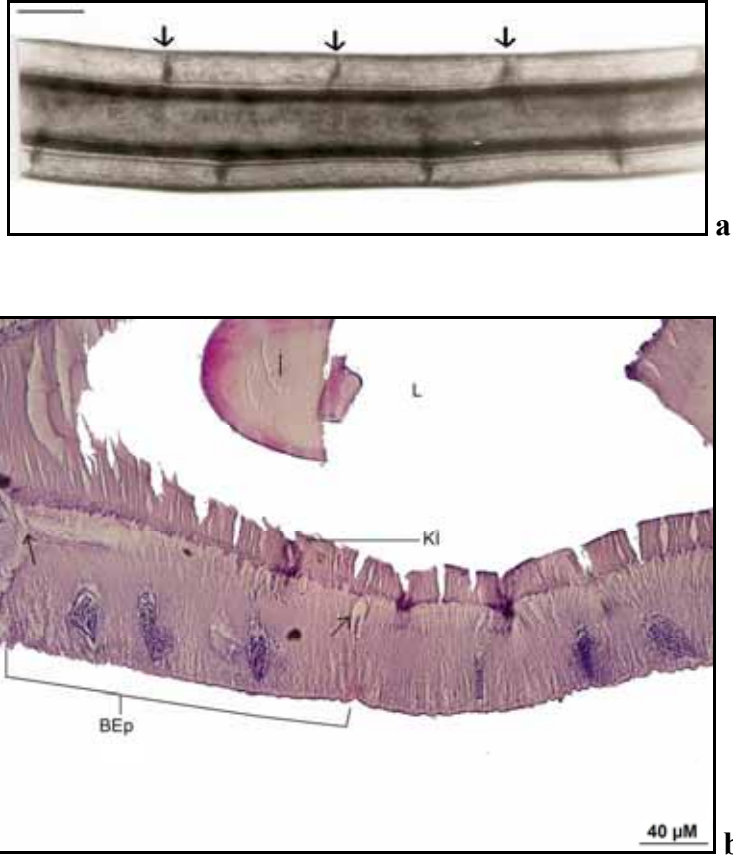
Şekil 3.14 (0.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), d) 100X, e) Negatif kontrol. Ekdizon reseptör B1(EcR B1), İpek(İ), Kütikula İntima (Kİ), Lümen (L), Nukleus (N).



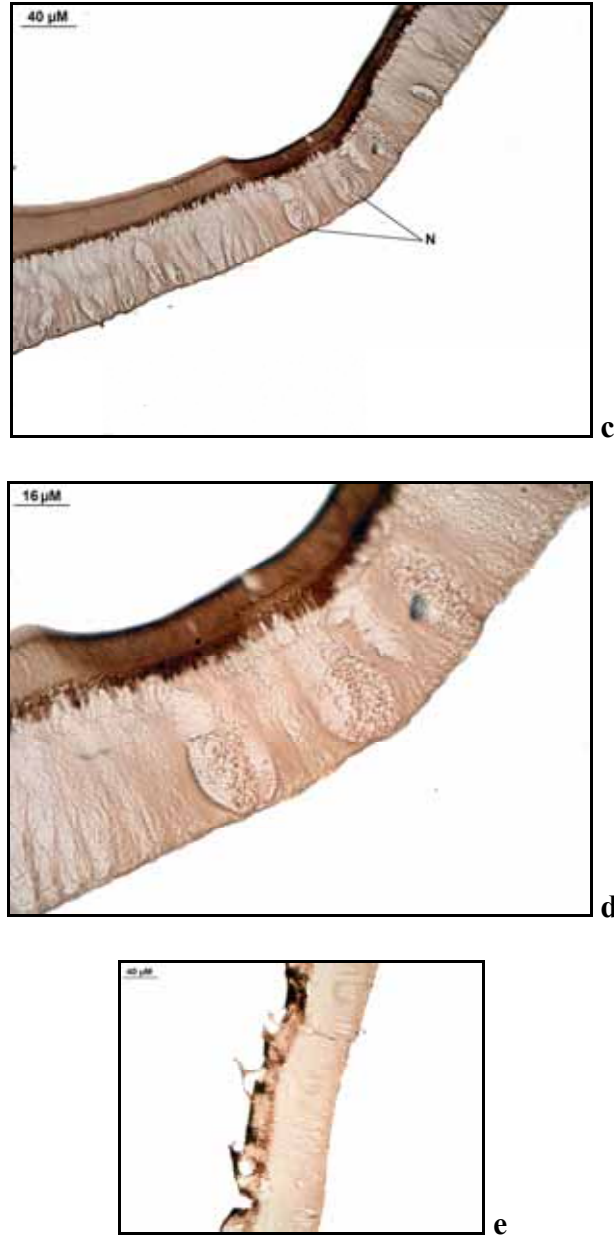
Şekil 3.15. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), Kütikula İntima (KI) (a) için Skala bar 100 µm'dir.



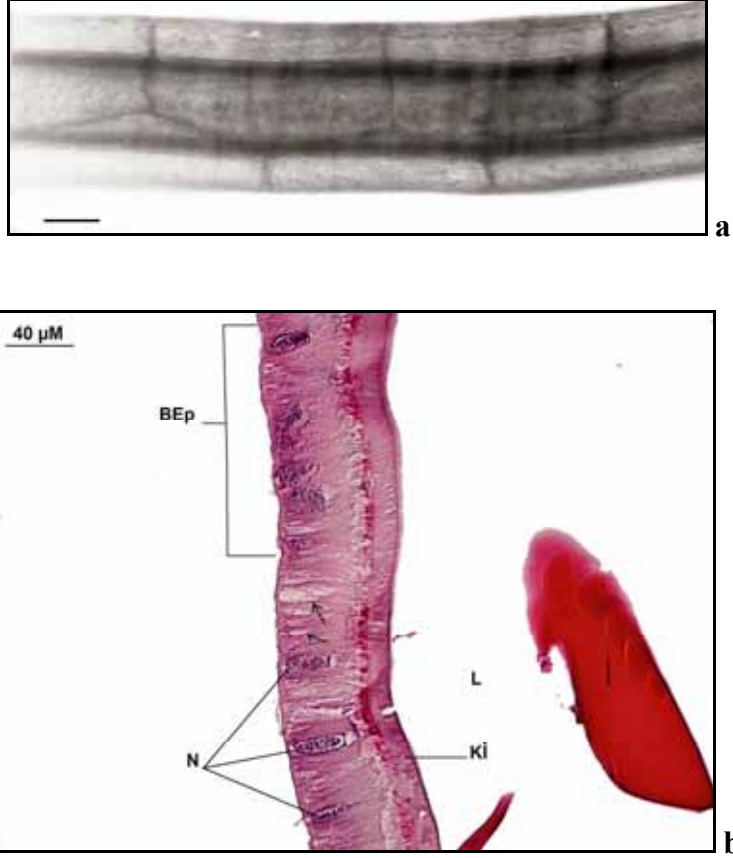
Şekil 3.15 (0.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), d) 100X, c) Negatif kontrol. Nukleus (N).



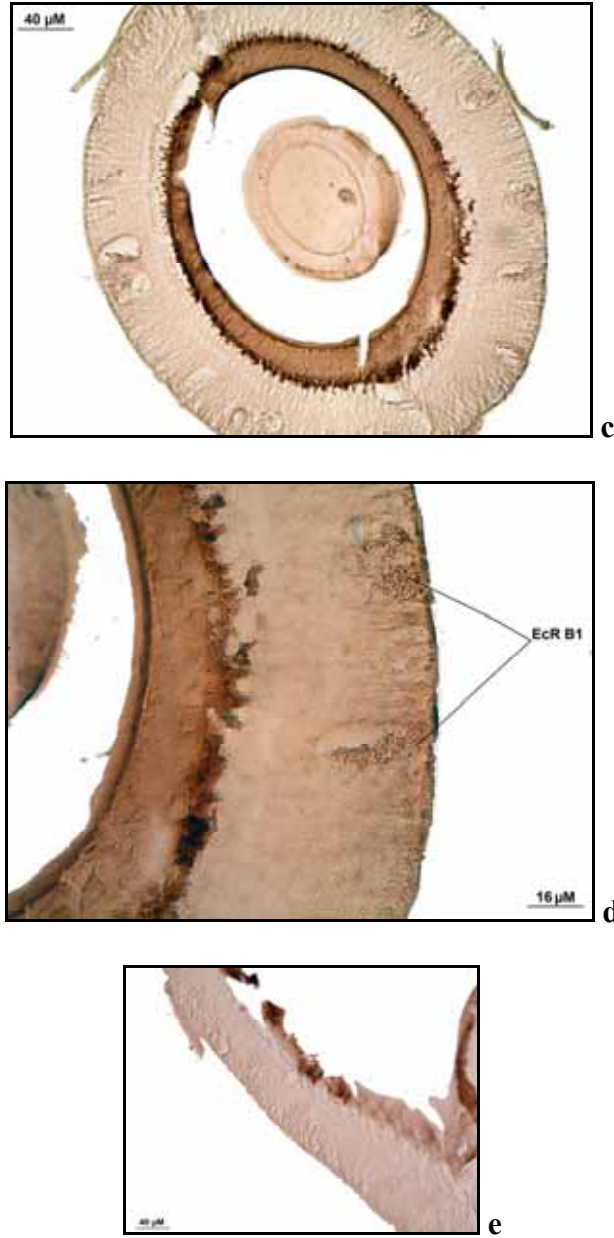
Şekil 3.16. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), İpek (İ) Kutikula İntima (KI), Lümen (L), ok hücrelerarası alanı göstermektedir (a) için Skala bar 100 µm'dir.



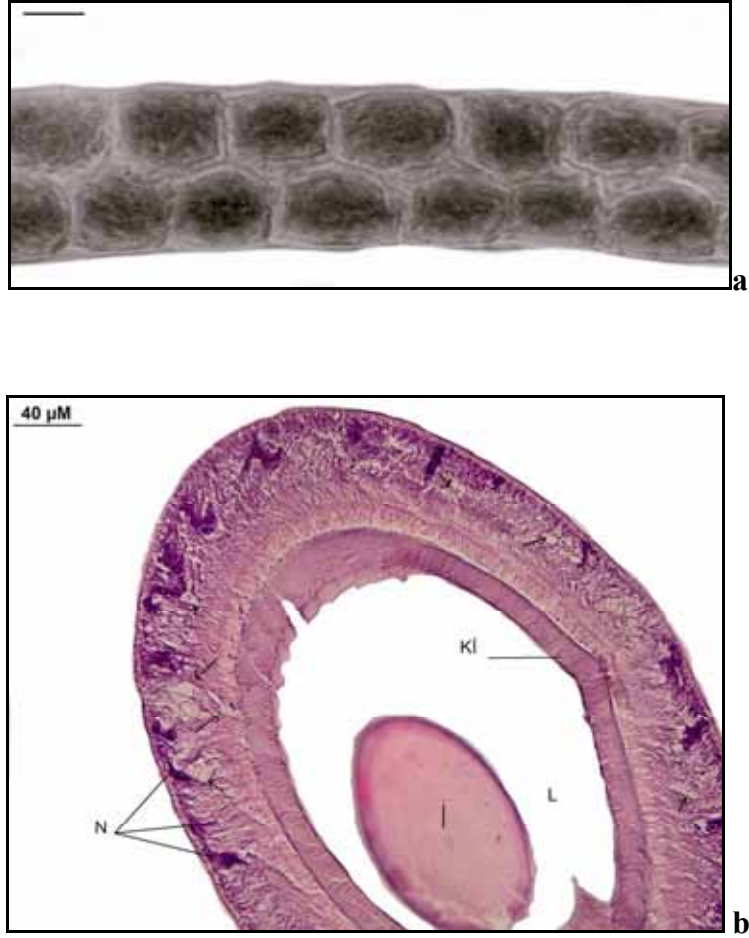
Şekil 3.16 (0.gün-1ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X **e)** Negatif kontrol. Nukleus (N)



Şekil 3.17. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), Kütikula İntima (Kİ), Lümen (L), nukleus (N), oklar hücrelerde meydana gelen vakuollerini göstermektedir, (a) için Skala bar 100 µm'dir.



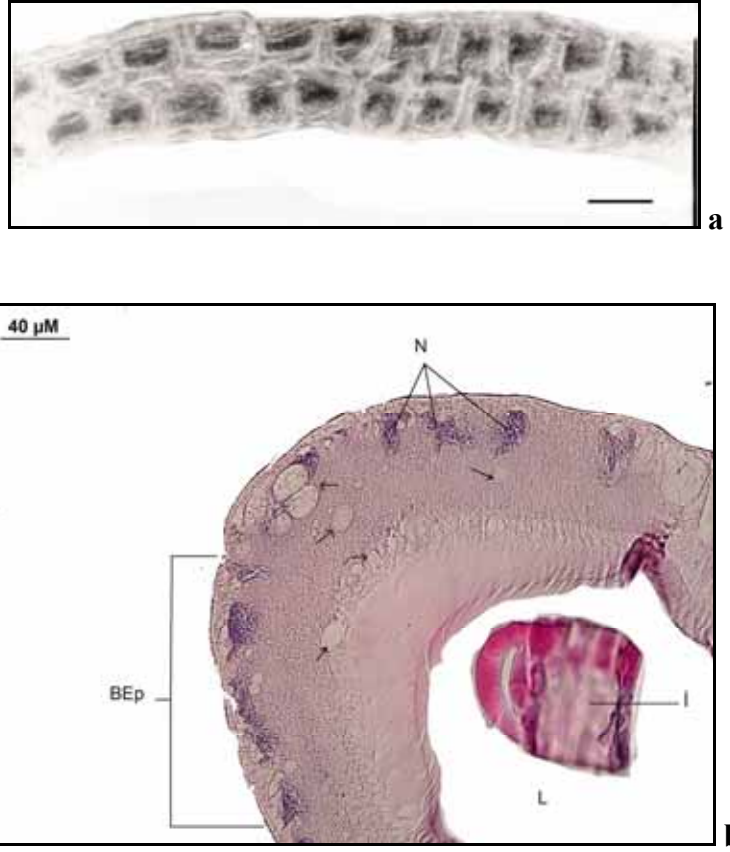
Şekil 3.17 (0.gün-1ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X, **e)** c) Negatif kontrol. Ekdizon reseptör B1 (EcR B1).



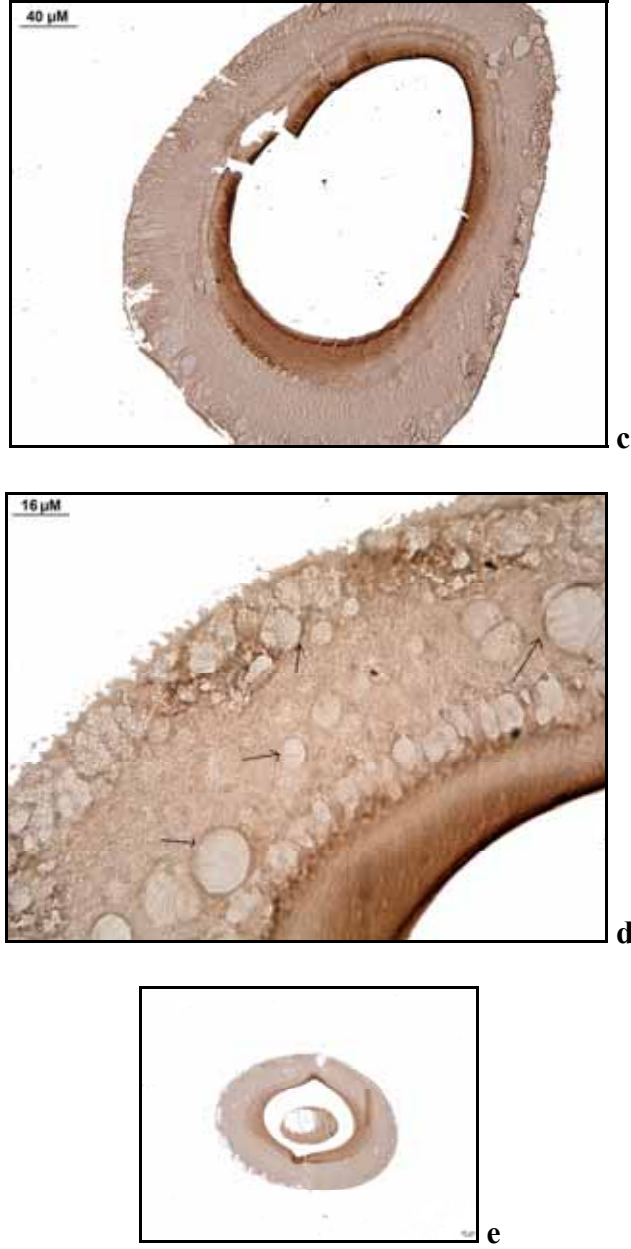
Şekil 3.18. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). ipek (İ), Kutikula İntima (Kİ), Lümen (L), nükleus (N), oklar hücrelerde meydana gelen vakuollerini göstermektedir (a) için Skala bar 100 µm'dir.



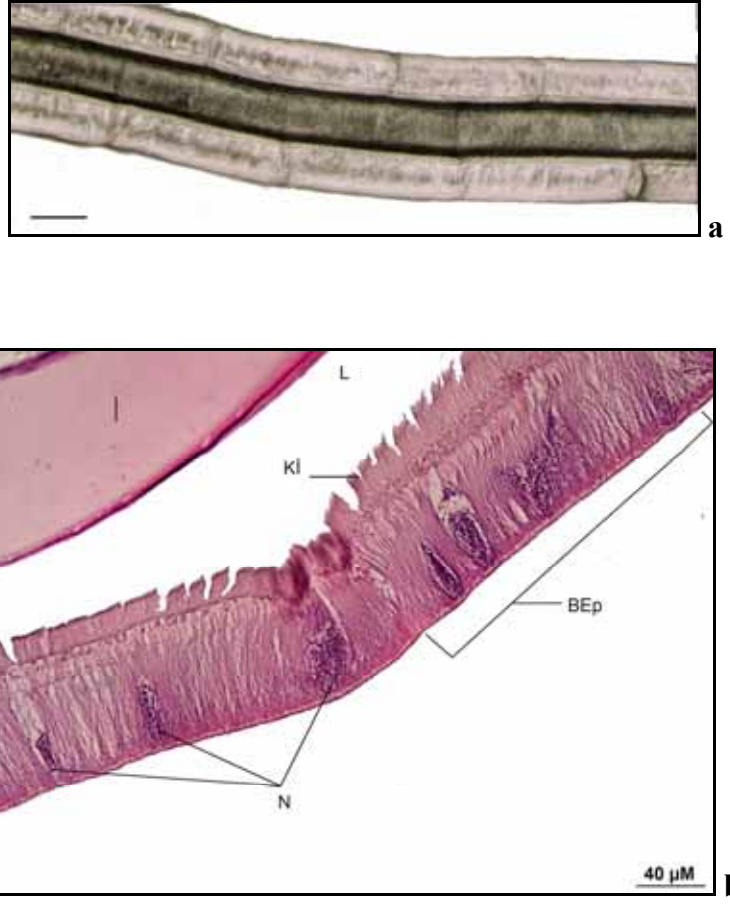
Şekil 3.18 (0.gün-1ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X) **d)** 100X **e)** Negatif kontrol. Ekdizon Reseptör B1 (EcR B1)



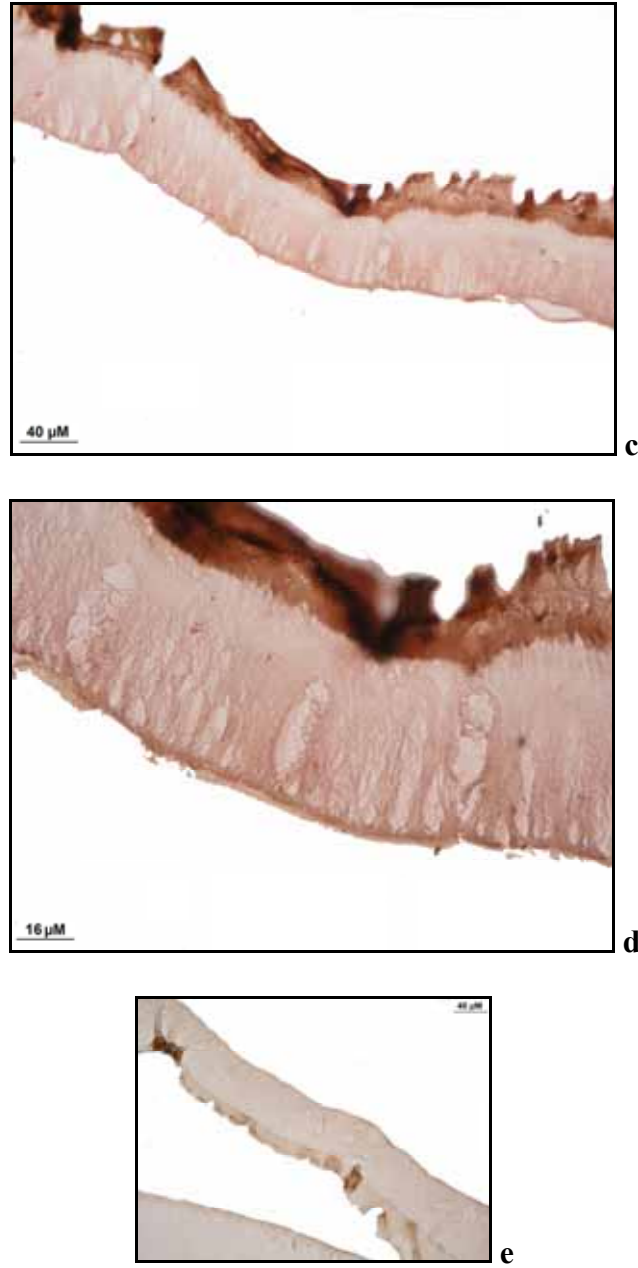
Şekil 3.19. (0.gün-1ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), Lümen (L), nukleus (N), oklar hücrelerde meydana gelen otofajik vakuolleri göstermektedir, (a) için Skala bar 100 µm'dir.



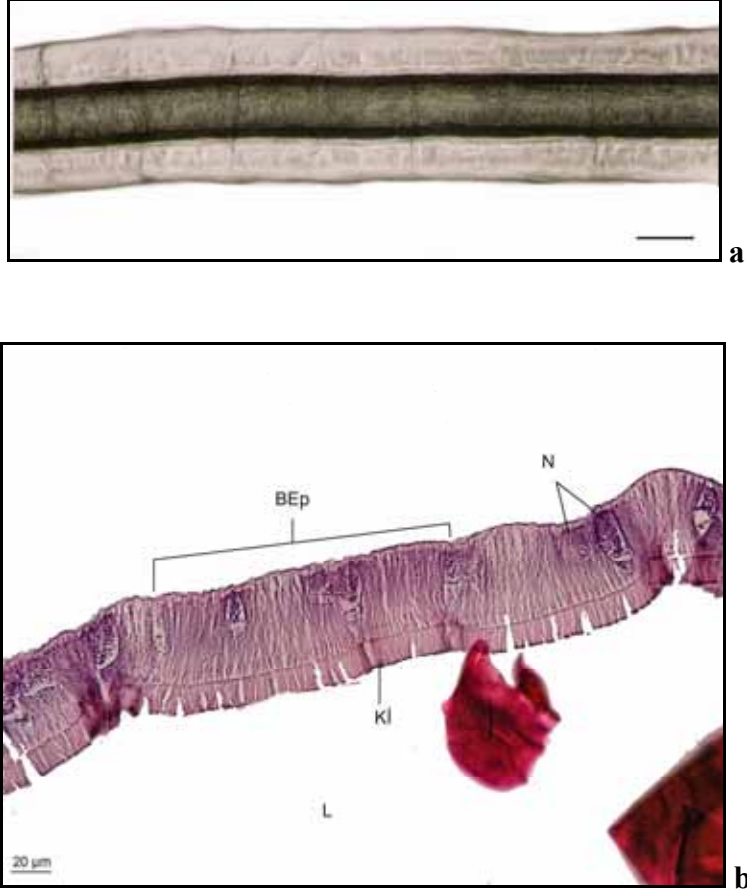
Şekil 3.19 (0.gün-1ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol. Oklar hücreler içerisindeki otofajik vakuolleri göstermektedir.



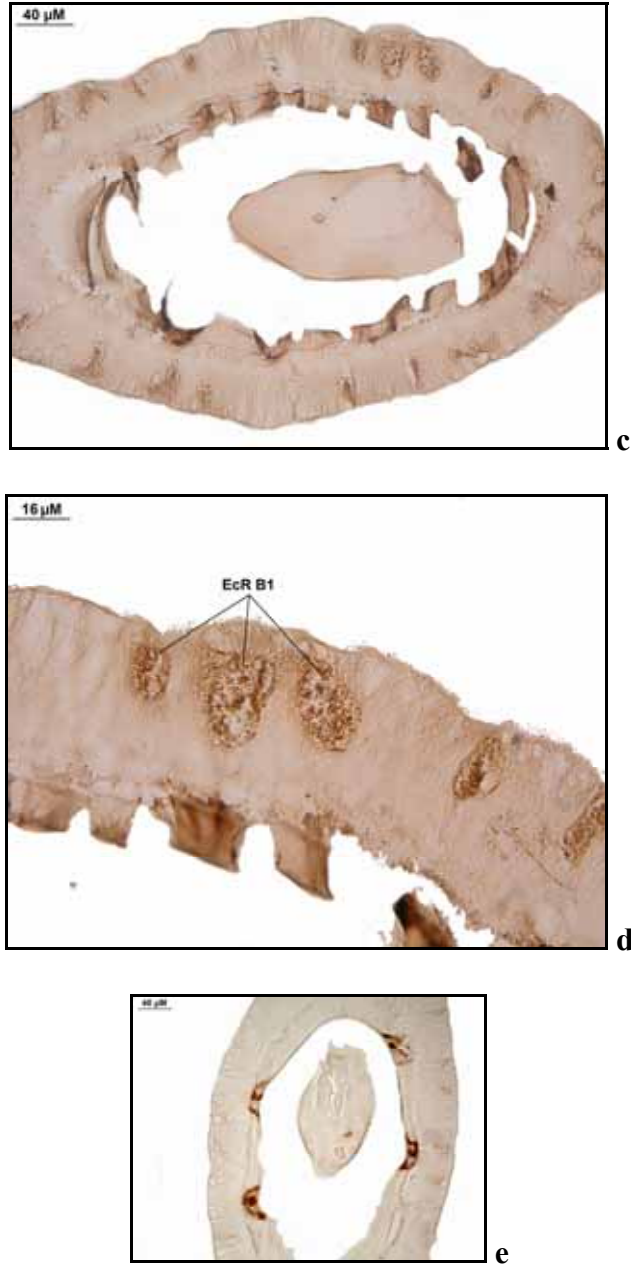
Şekil 3.20. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ). Lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



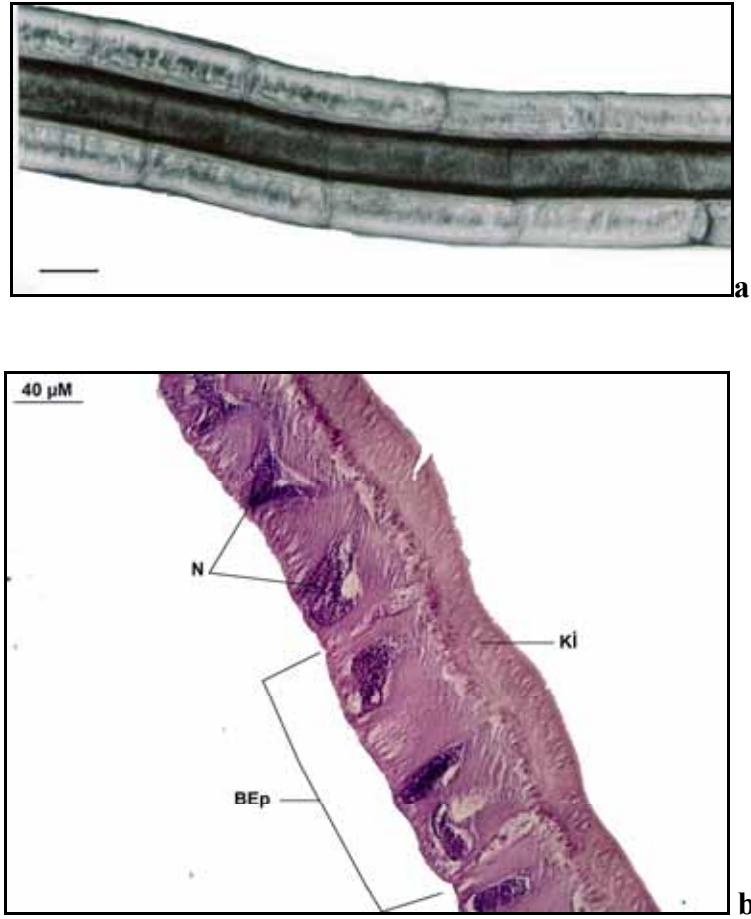
Şekil 3.20 (0.gün-10ng) uygulama grubunda 7.günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), **d)**100X; **e)** Negatif kontrol.



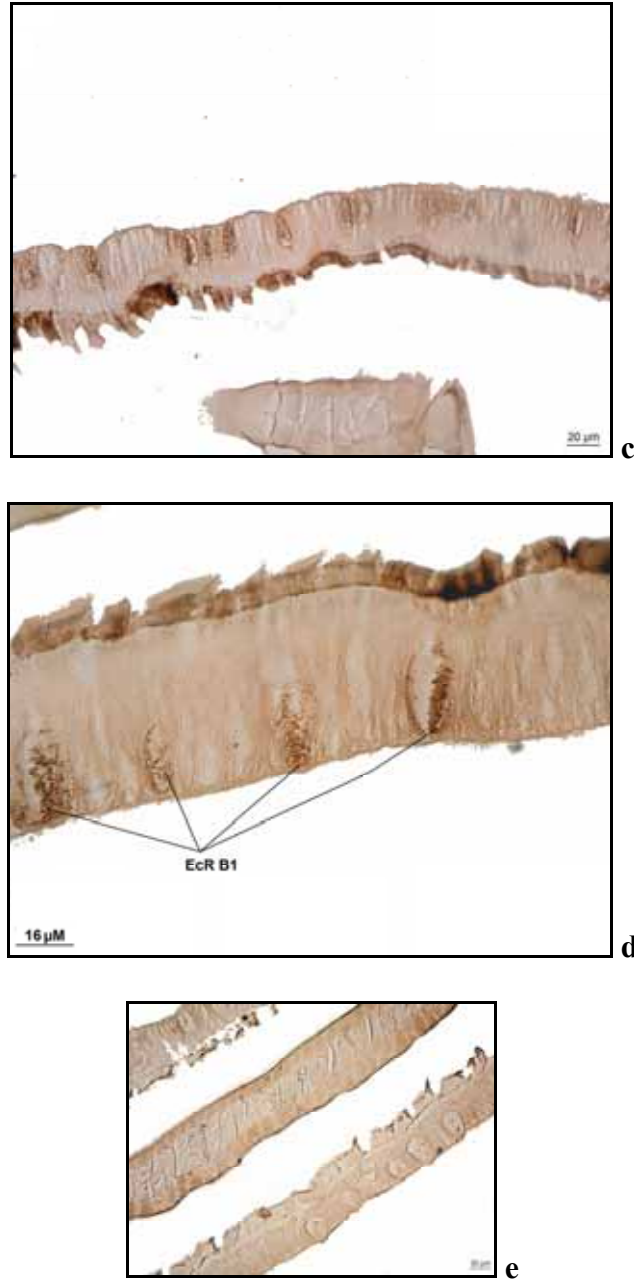
Şekil 3.21. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ). Lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



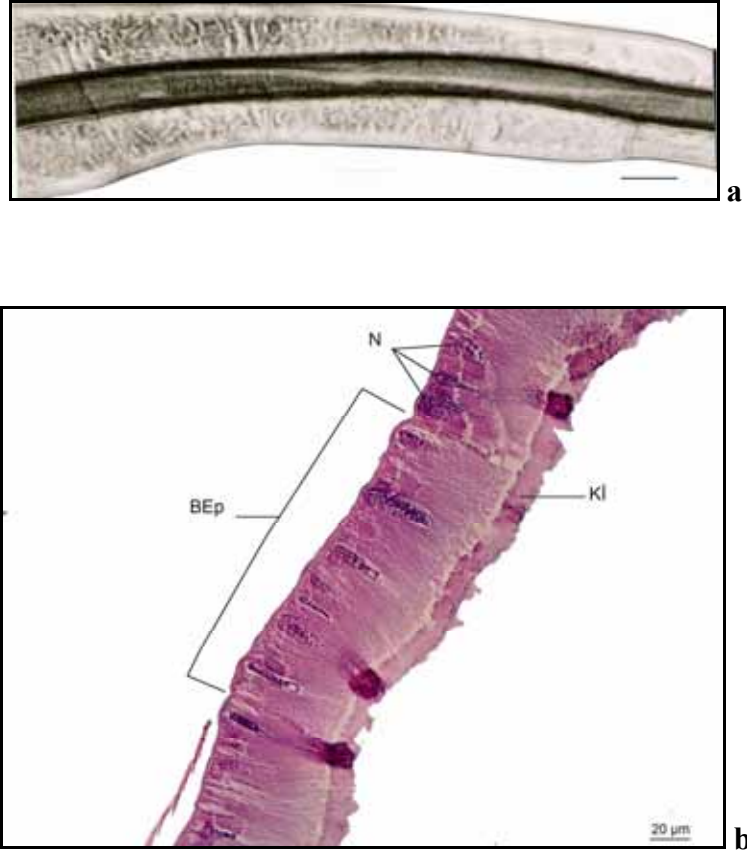
Şekil 3.21 (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol, Ekdizon reseptör B1(EcR B1)



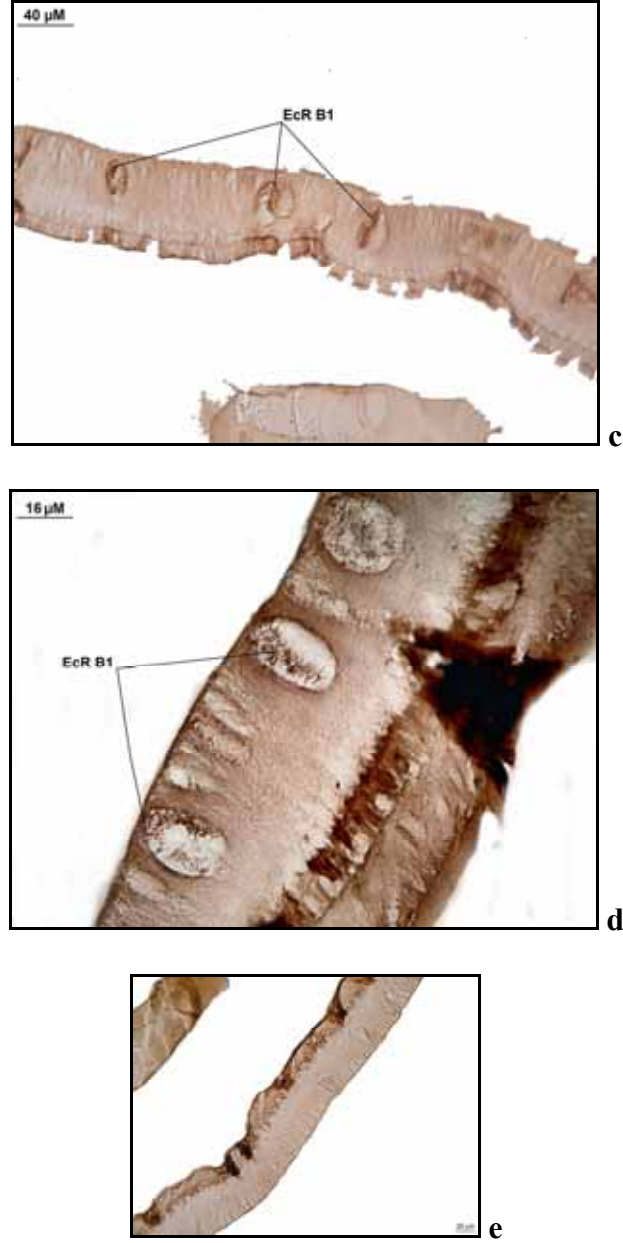
Şekil 3.22. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin) Bez epiteli (BEp), Kütikula İntima (Kİ), Nucleus (N) (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



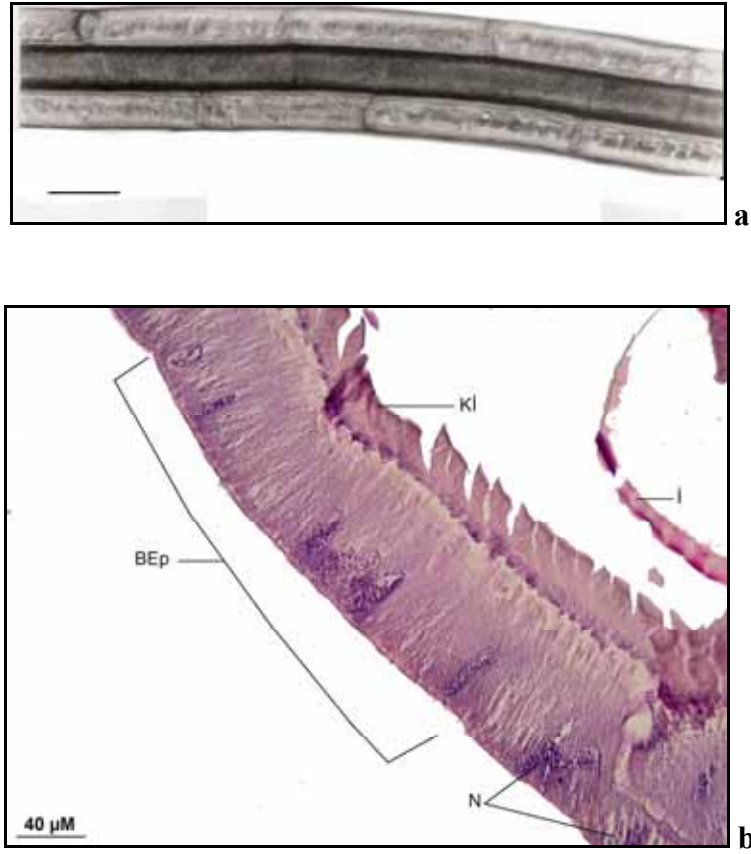
Şekil 3.22 (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol, Ekdizon reseptör B1 (EcR B1)



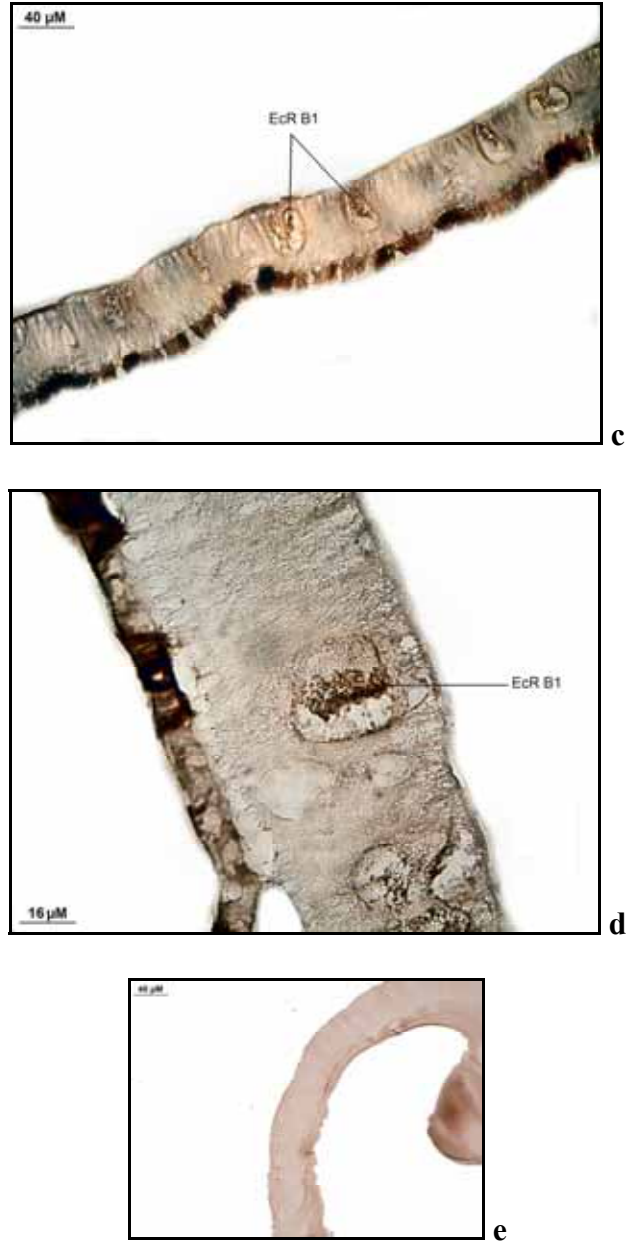
Şekil 3.23. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 10 günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (KI), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



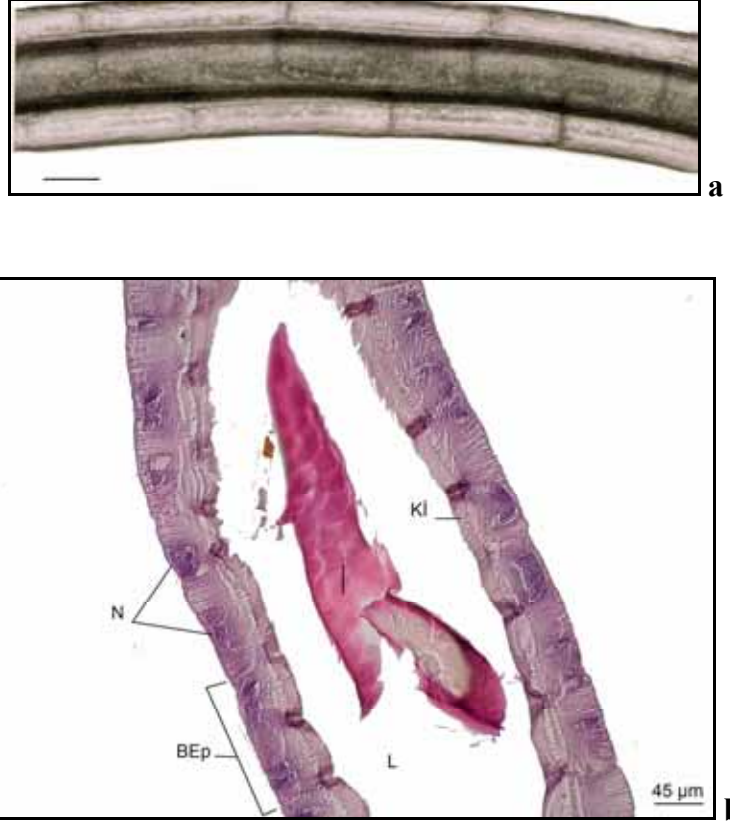
Şekil 3.23 (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol, Ekdizon reseptör B1 (EcR B1).



Şekil 3.24. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 11 günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ), Nükleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



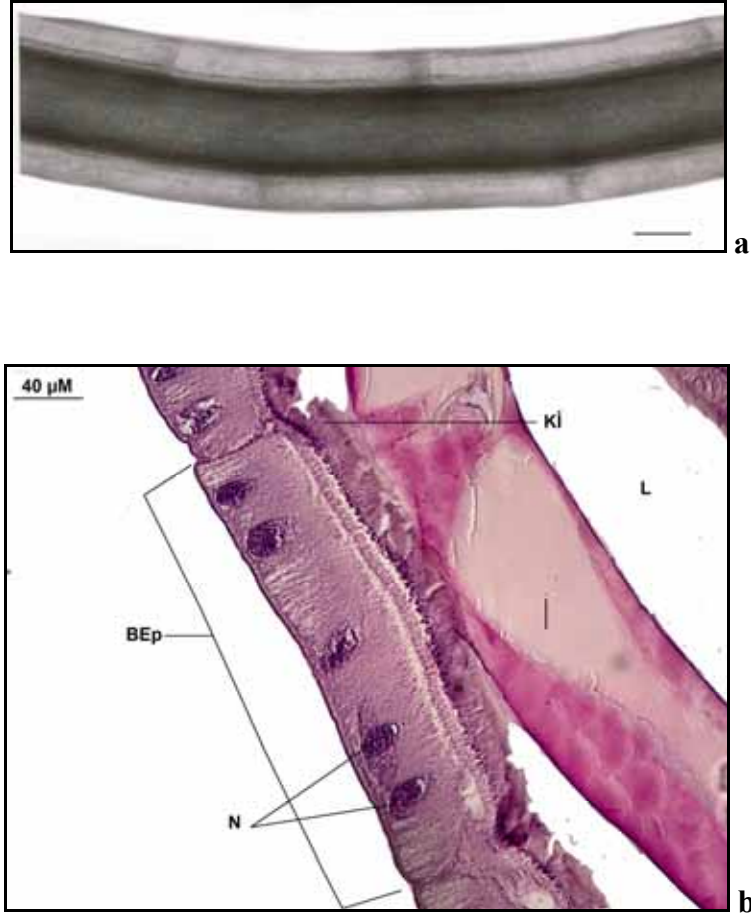
Şekil 3.24 (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)**100X; **e)**Negatif kontrol, Ekdizon reseptör B1 (EcR B1).



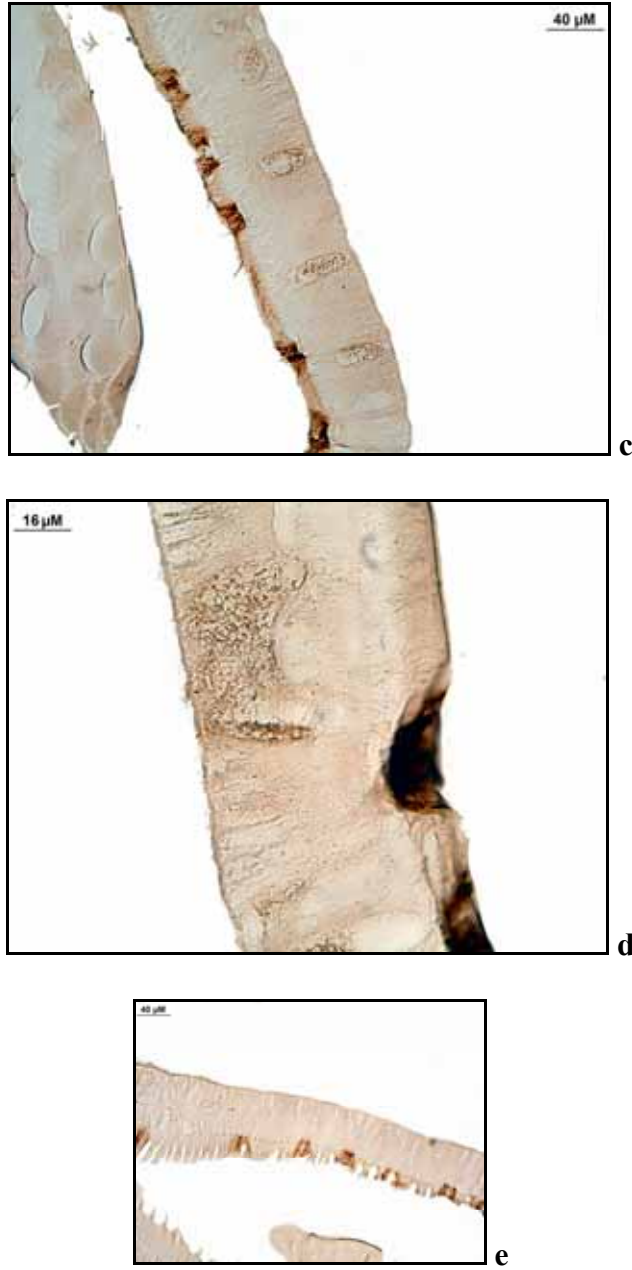
Şekil 3.25. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 12 günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ), lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



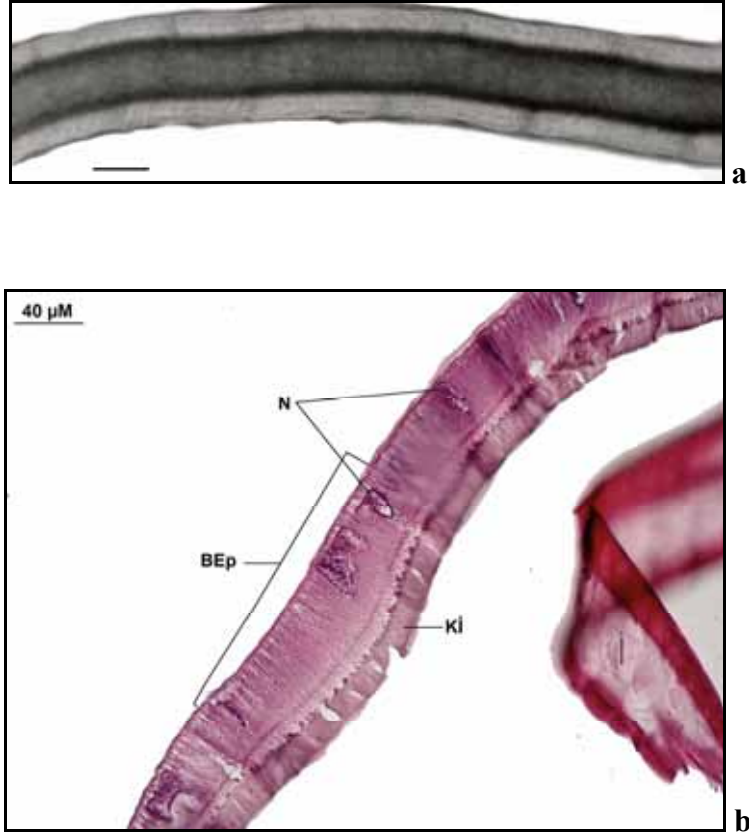
Şekil 3.25 (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



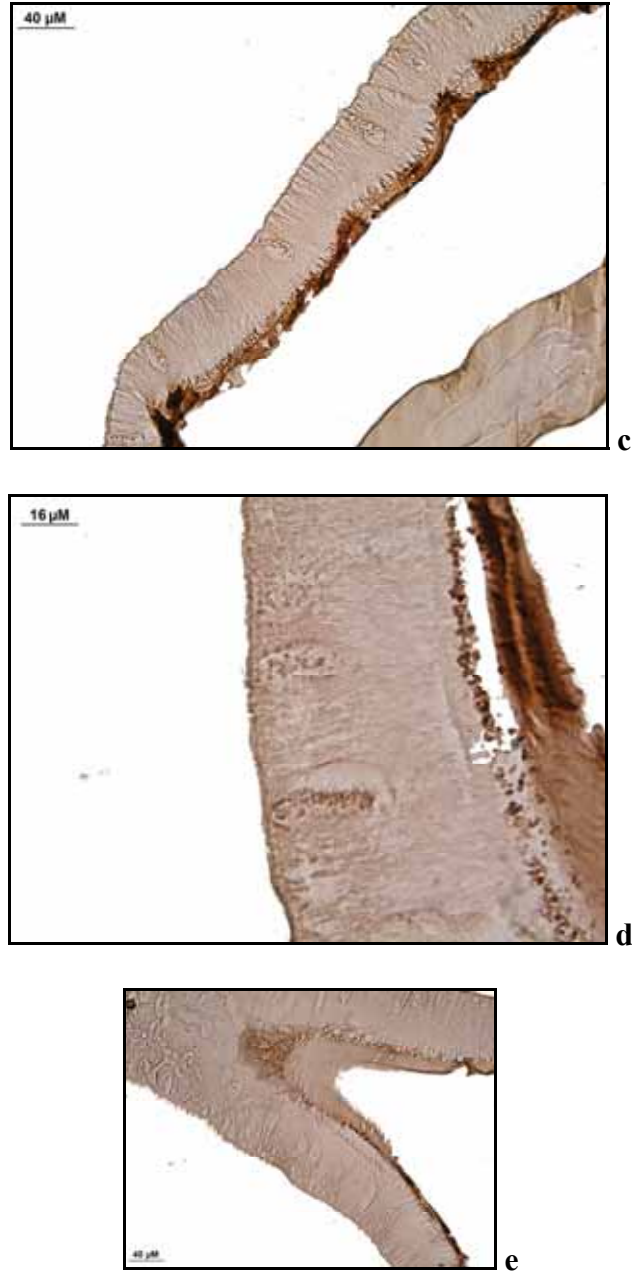
Şekil 3.26. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 13 günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ); kütikula intima (Kİ), lümen (L); Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



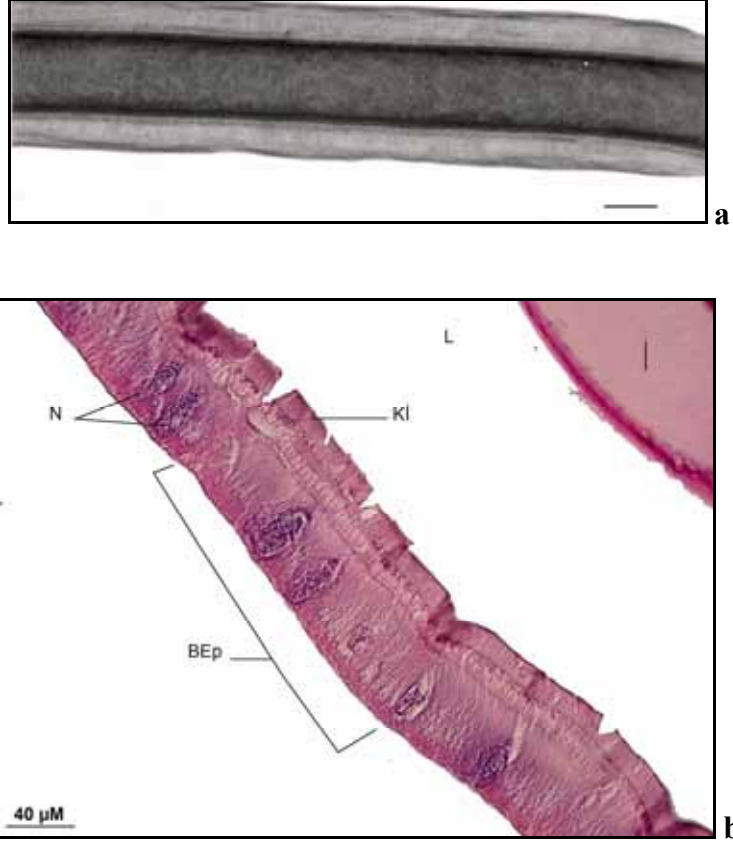
Şekil 3.26 (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)**Negatif kontrol



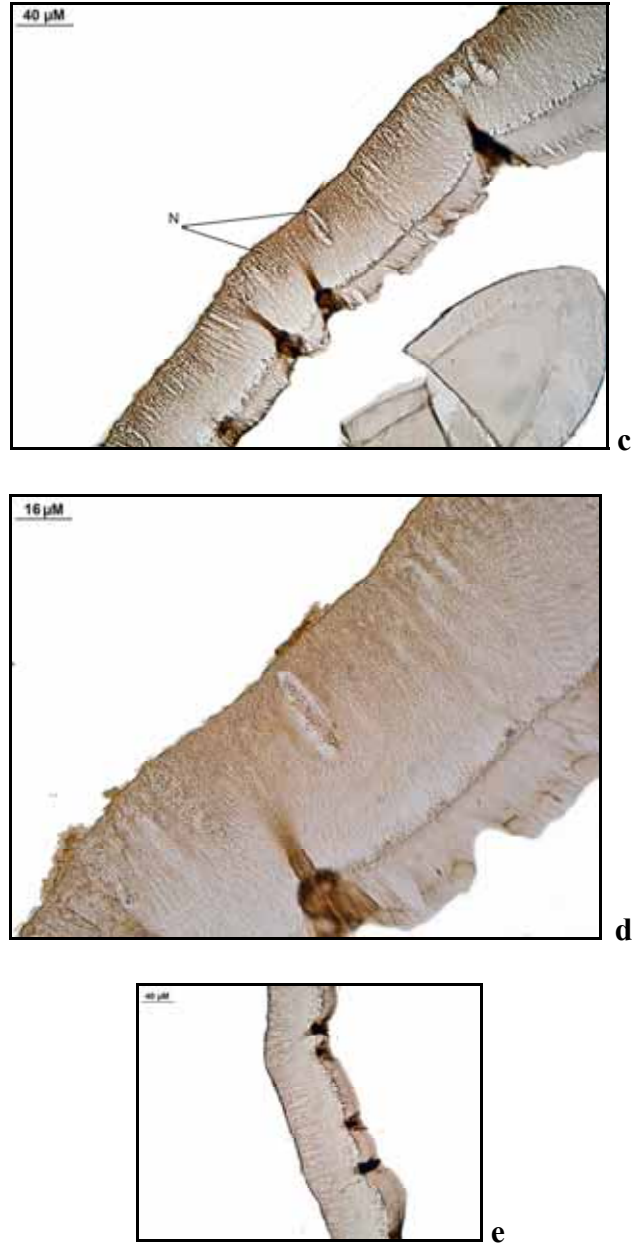
Şekil 3.27. (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 14 günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



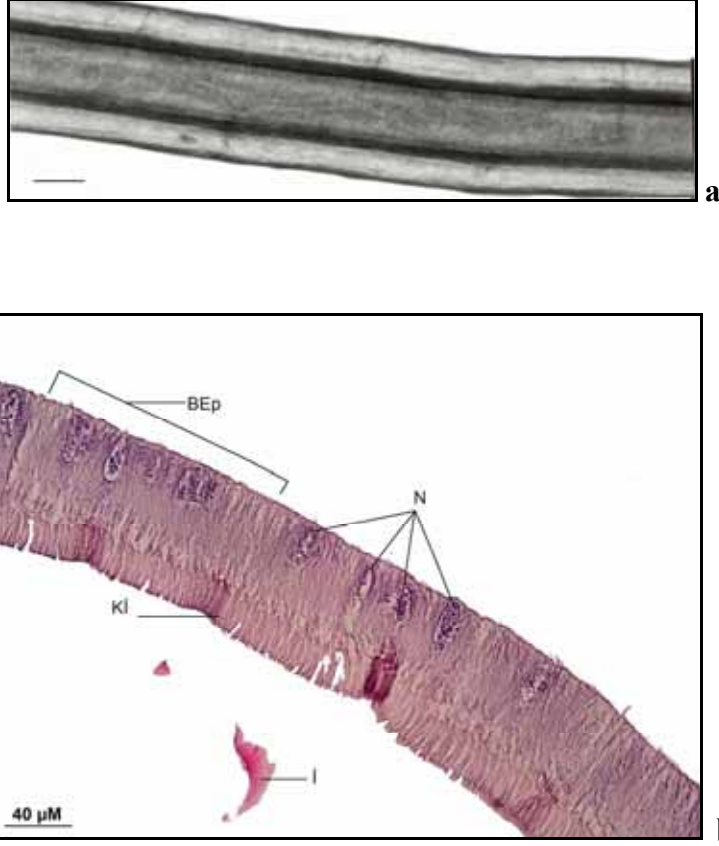
Şekil 3.27 (0.gün-10 ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



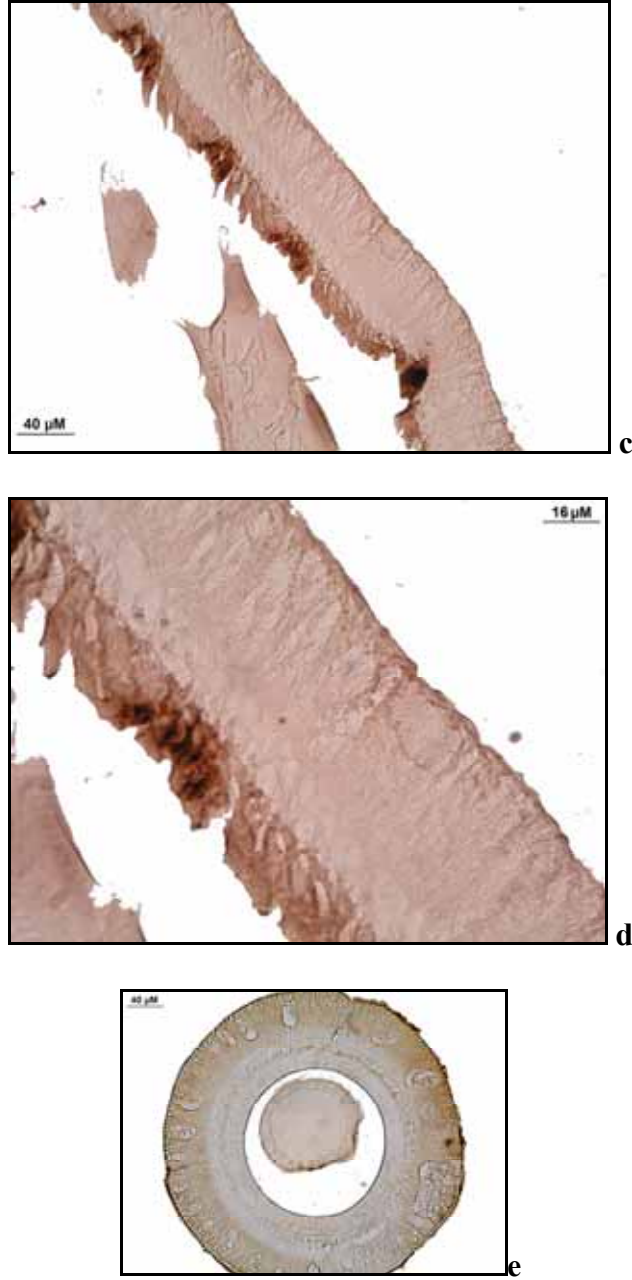
Şekil 3.28. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), Lümen (L), nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



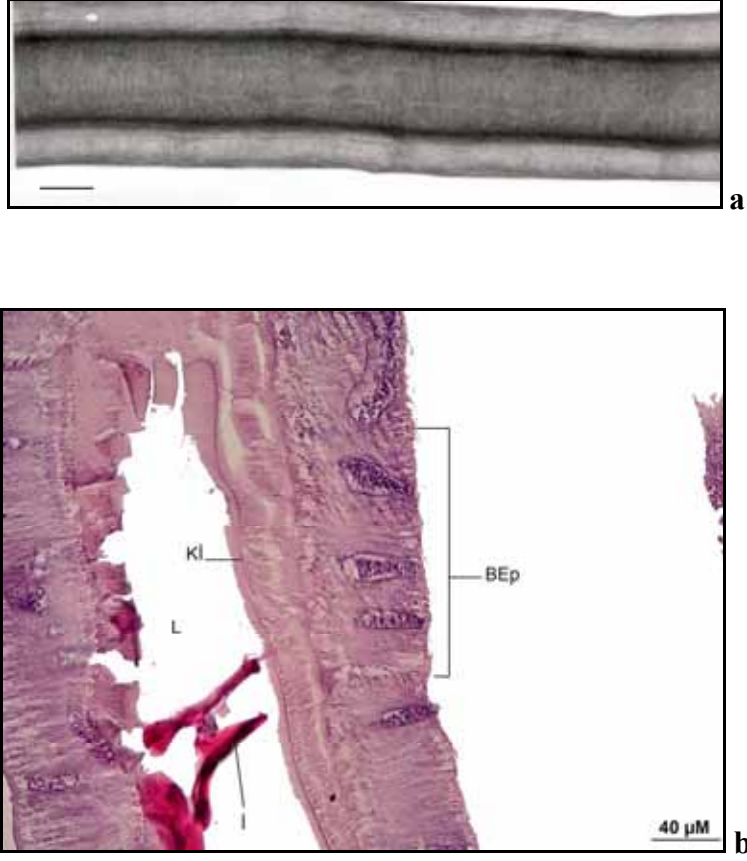
Şekil 3.28 (3.gün-1ng) uygulama grubunda 7 günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol, Nukleus (N),



Şekil 3.29. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ), nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



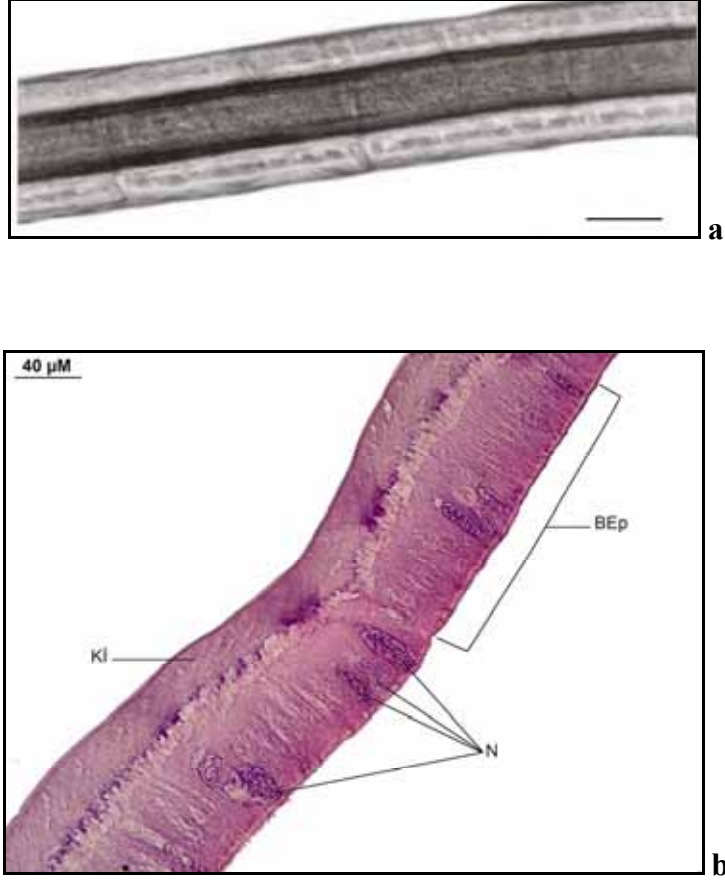
Şekil 3.29 (3.gün-1ng) uygulama grubunda 8 günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EeR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X, **e)** Negatif kontrol



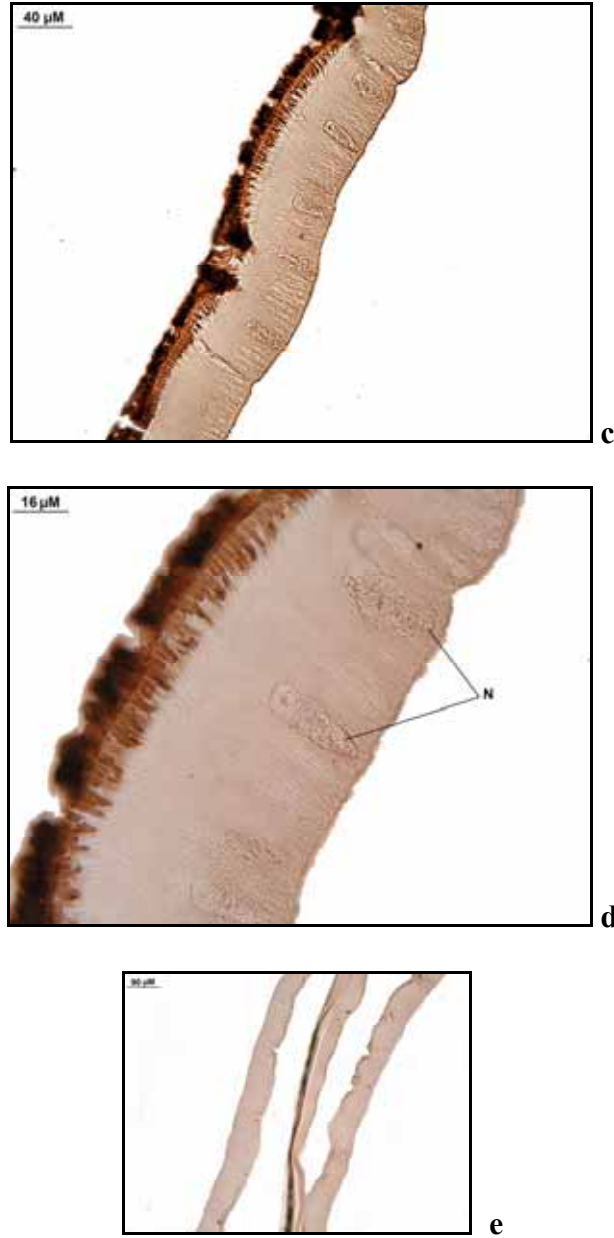
Şekil 3.30. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ), lümen (L), (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



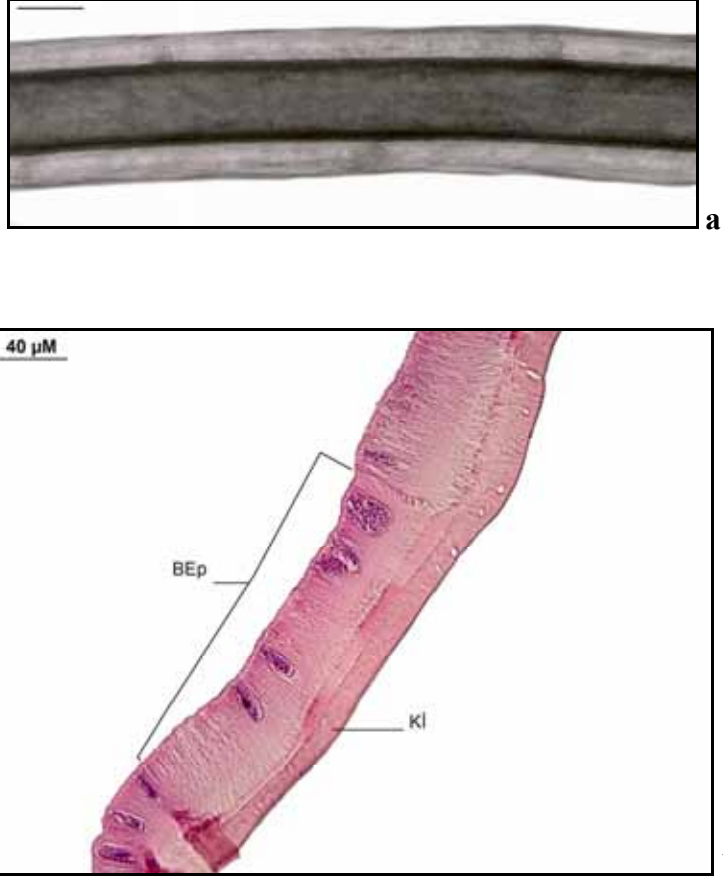
Şekil 3.30 (3.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının c) EcR B1⁺in immunohistokimyasal belirlenmesi; d) 100X; e) Negatif kontrol



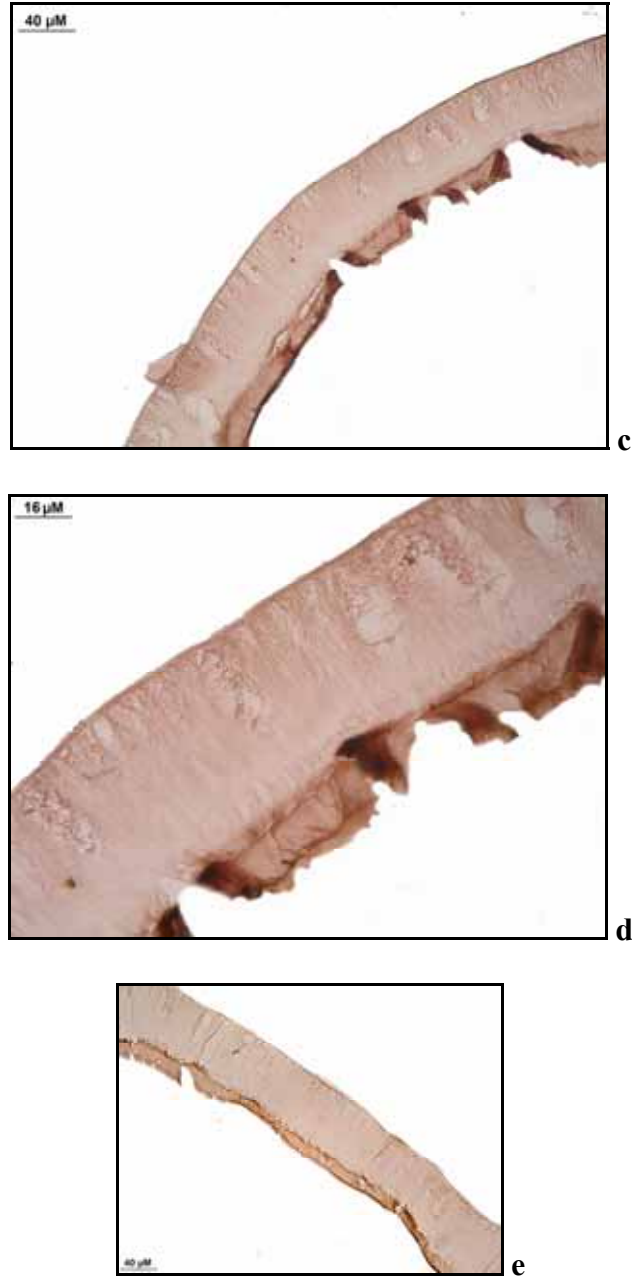
Şekil 3.31. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (Kİ), nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm'dir.



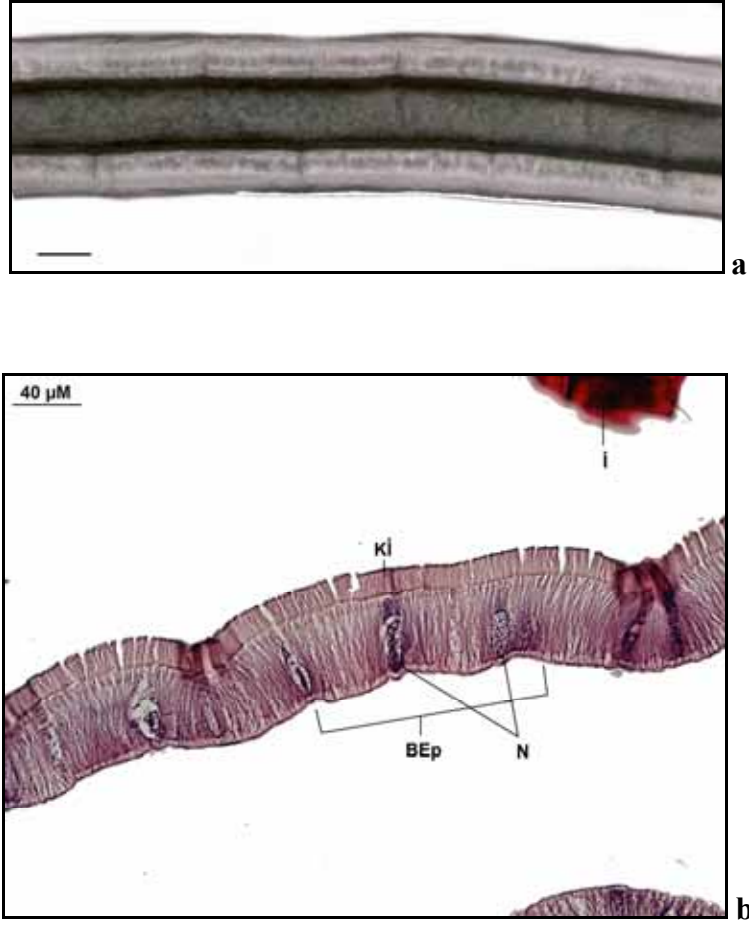
Şekil 3.31 (3.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



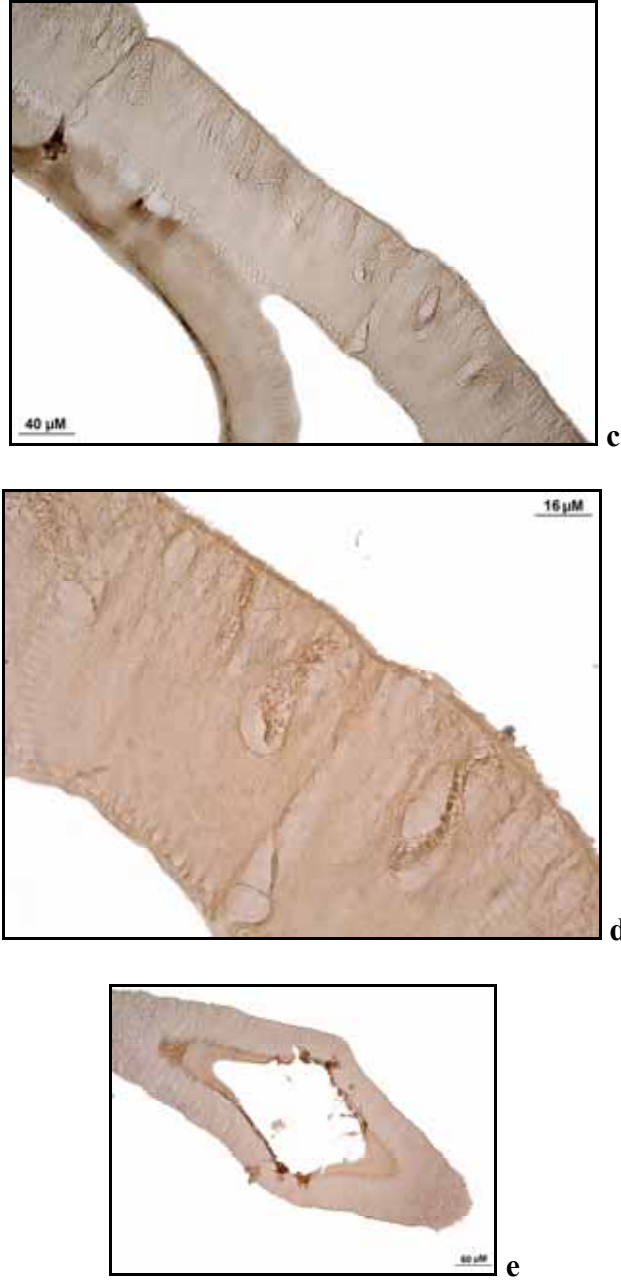
Şekil 3.32. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (Kİ), (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



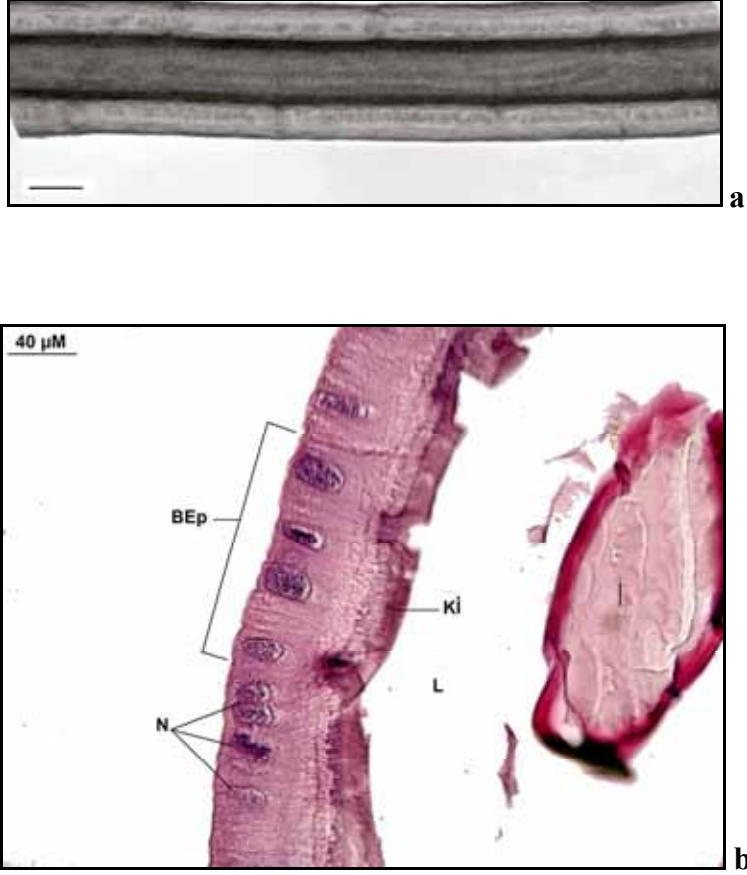
Şekil 3.32 (3.gün-1ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



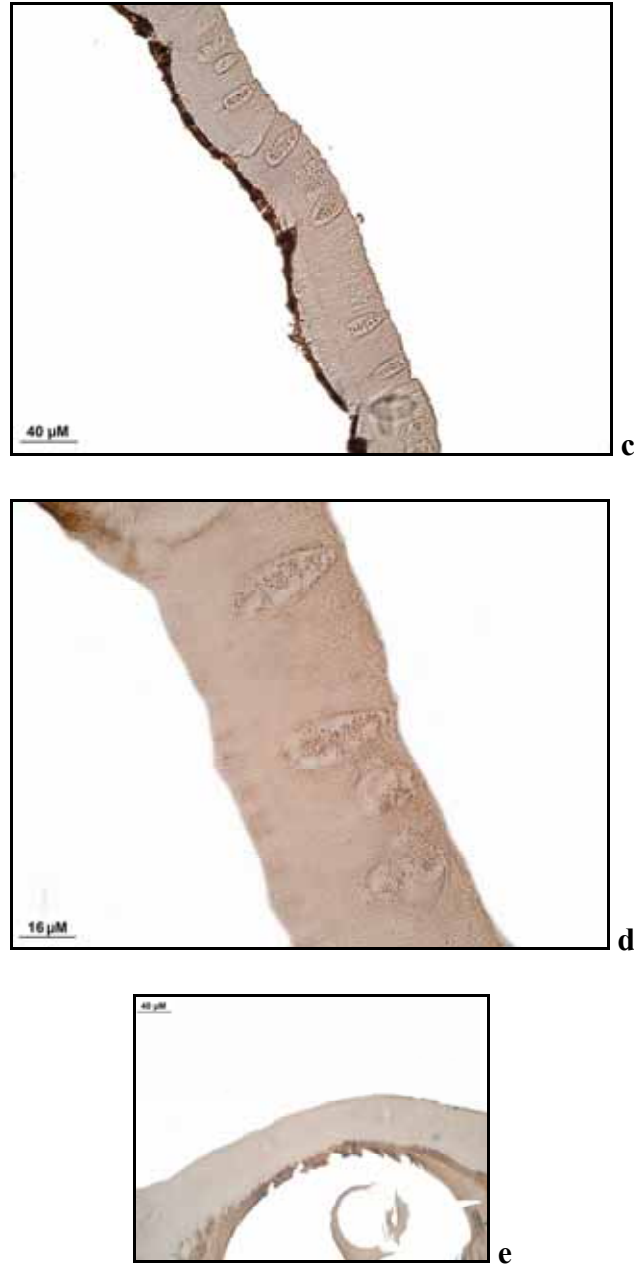
Şekil 3.33. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), İpek (İ), kütikula intima (KI). Lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



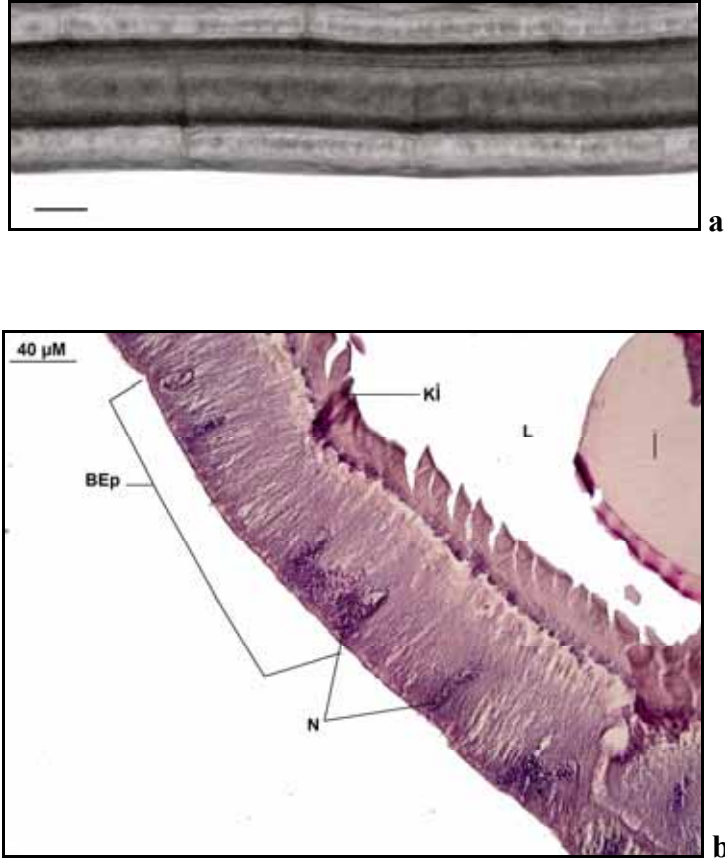
Şekil 3.33 (3.gün-1ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



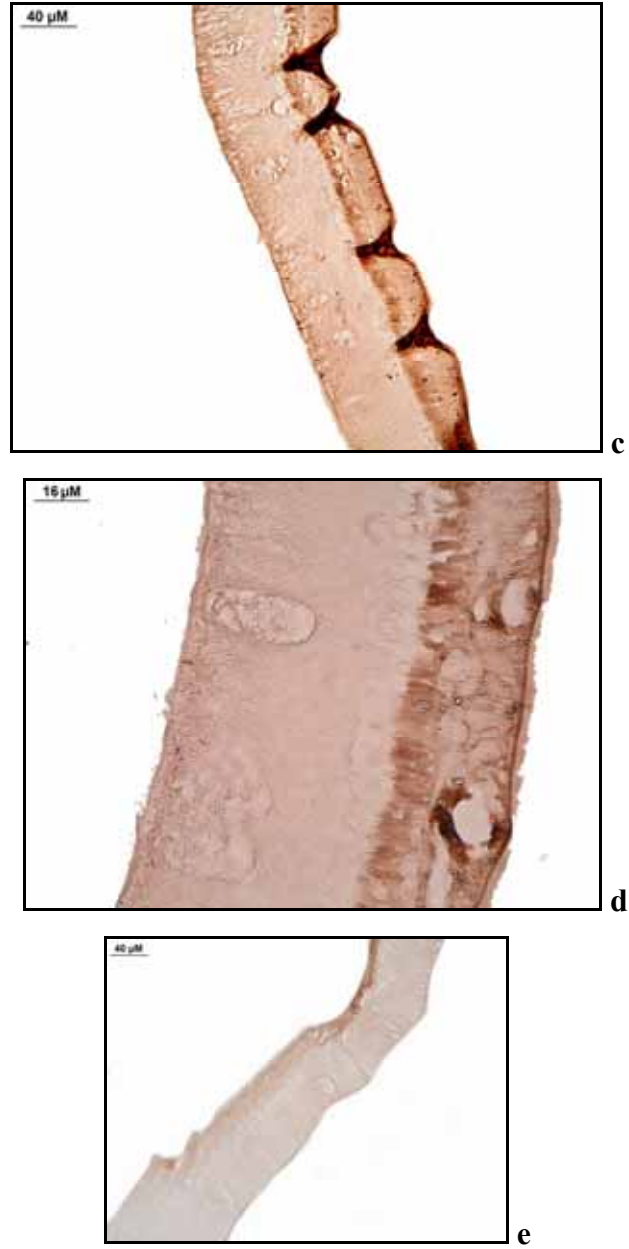
Şekil 3.34. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ). Lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm'dir.



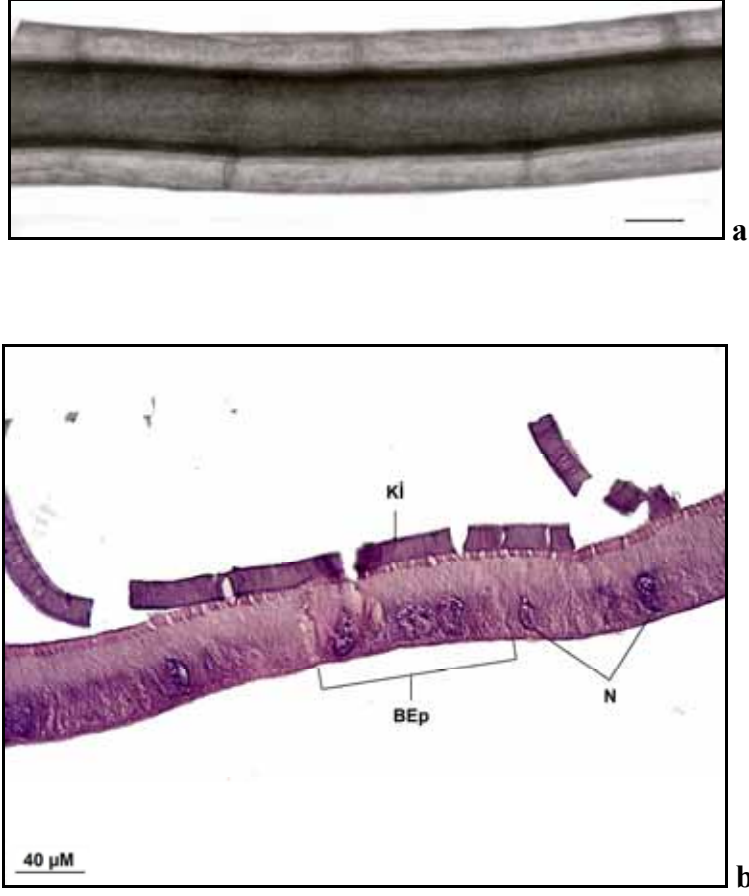
Şekil 3.34 (3.gün-1ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının **e)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol.



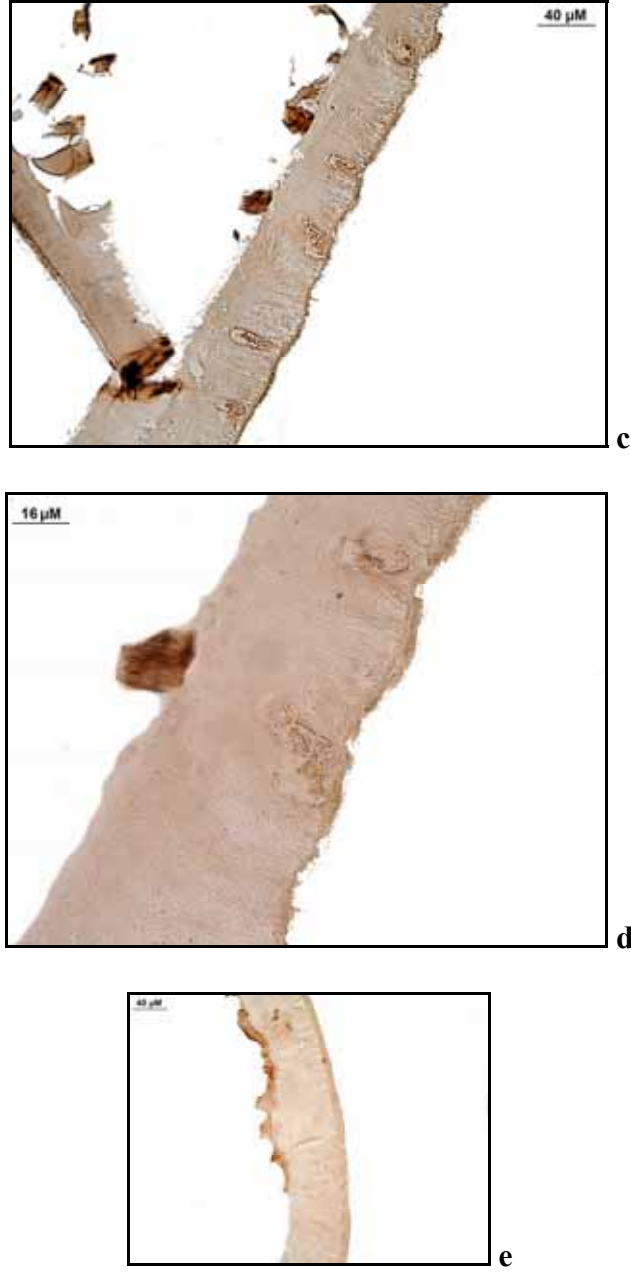
Şekil 3.35. (3.gün-1ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ). Lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



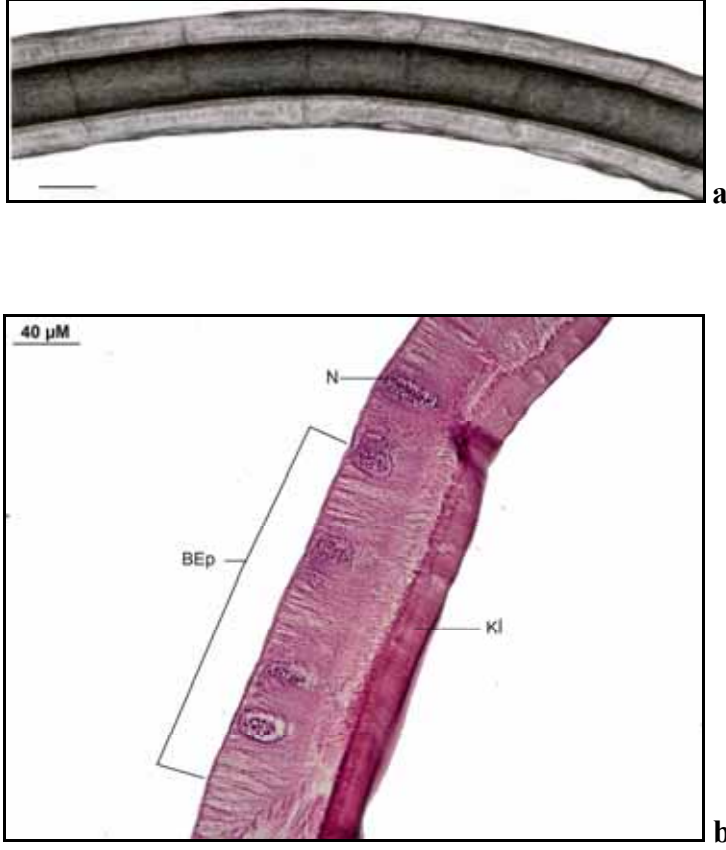
Şekil 3.35 (3.gün-1ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



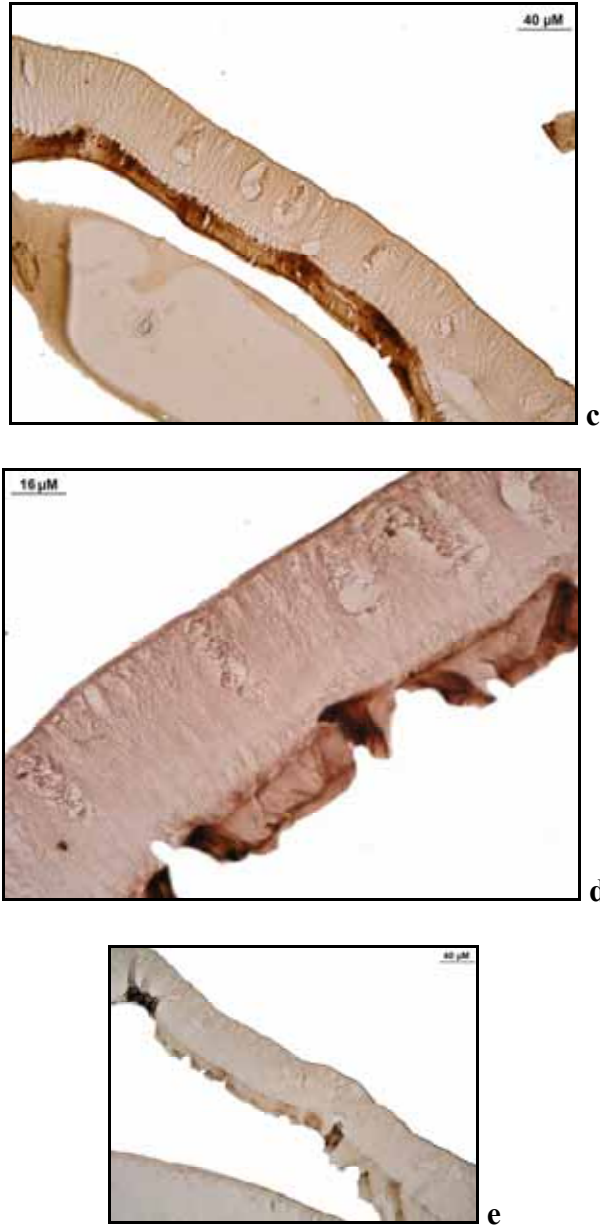
Şekil 3.36. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



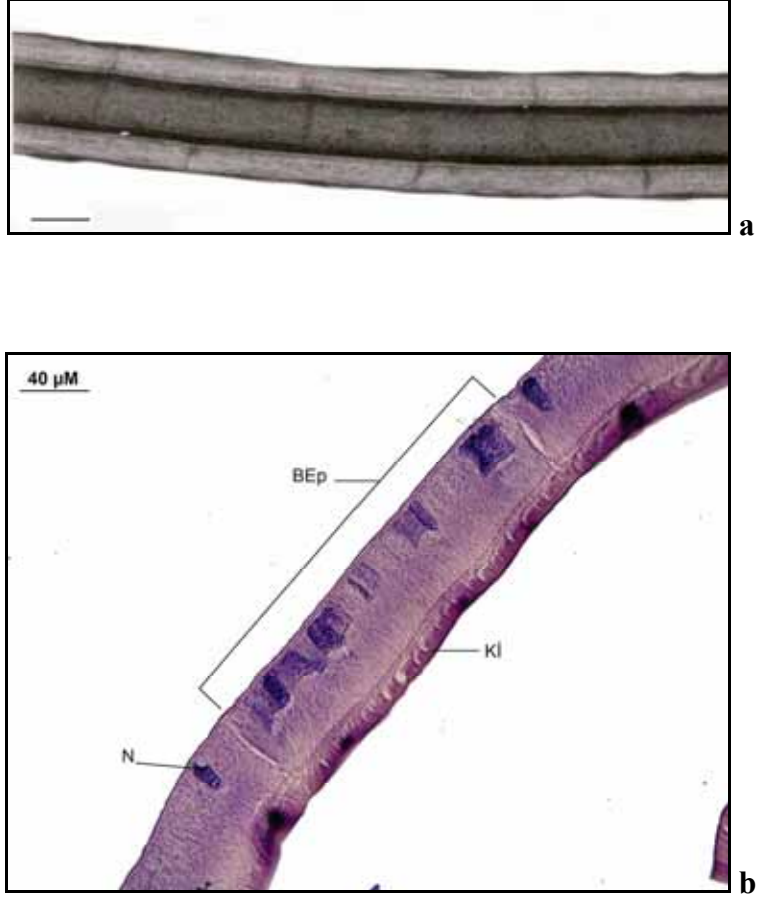
Şekil 3.36 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)**Negatif kontrol



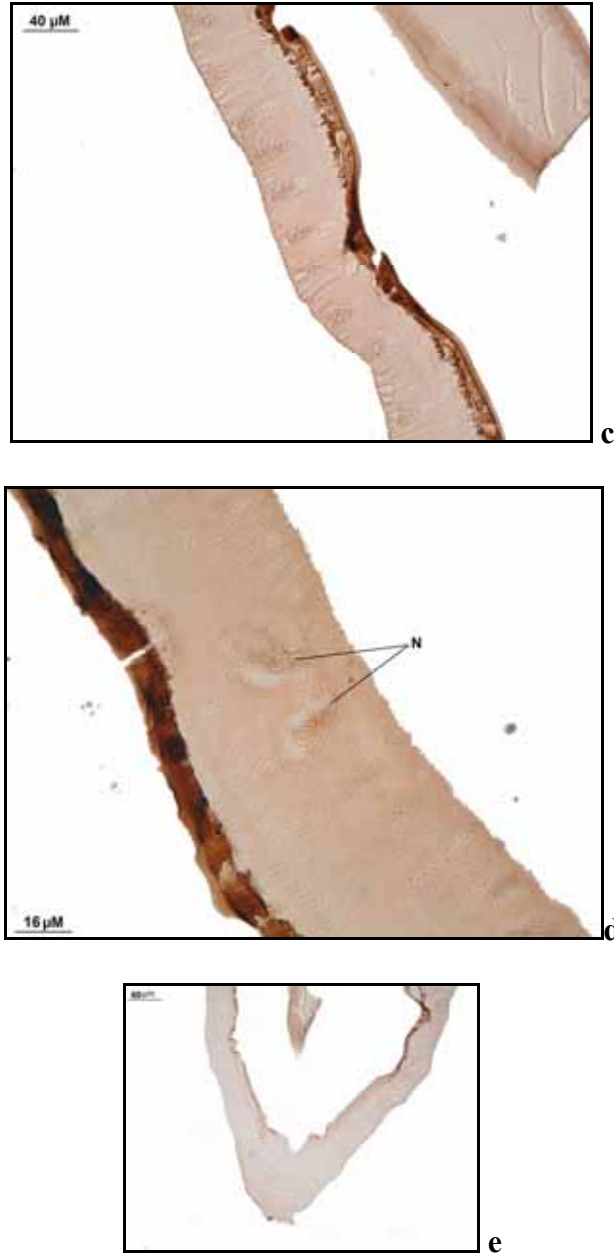
Şekil 3.37. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (Kİ), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



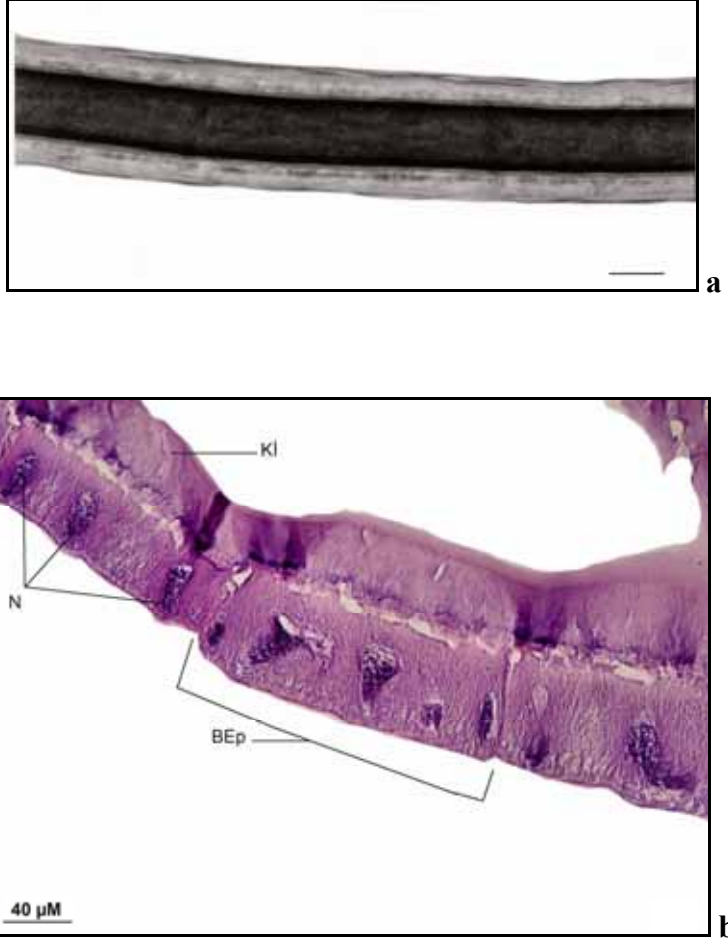
Şekil 3.37 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



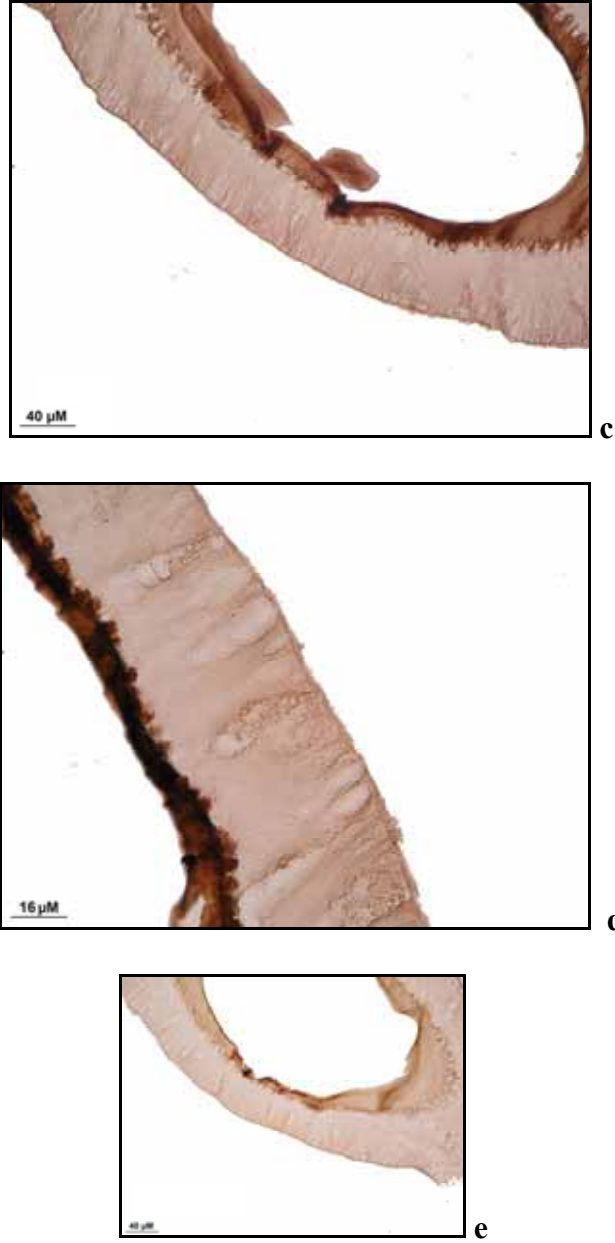
Şekil 3.38. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (Kİ), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm'dir.



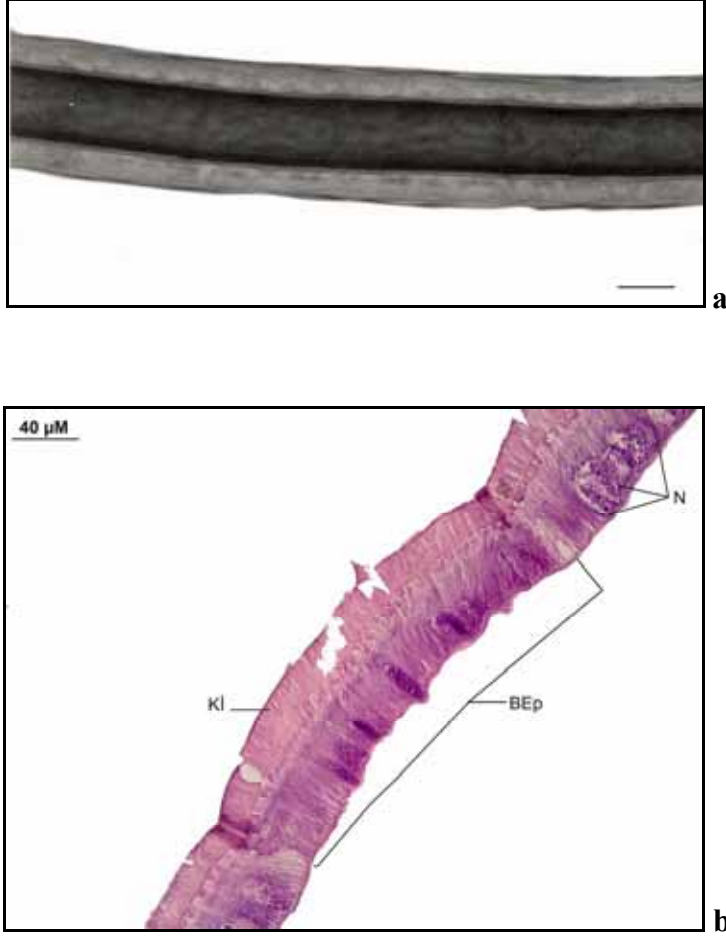
Şekil 3.38 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



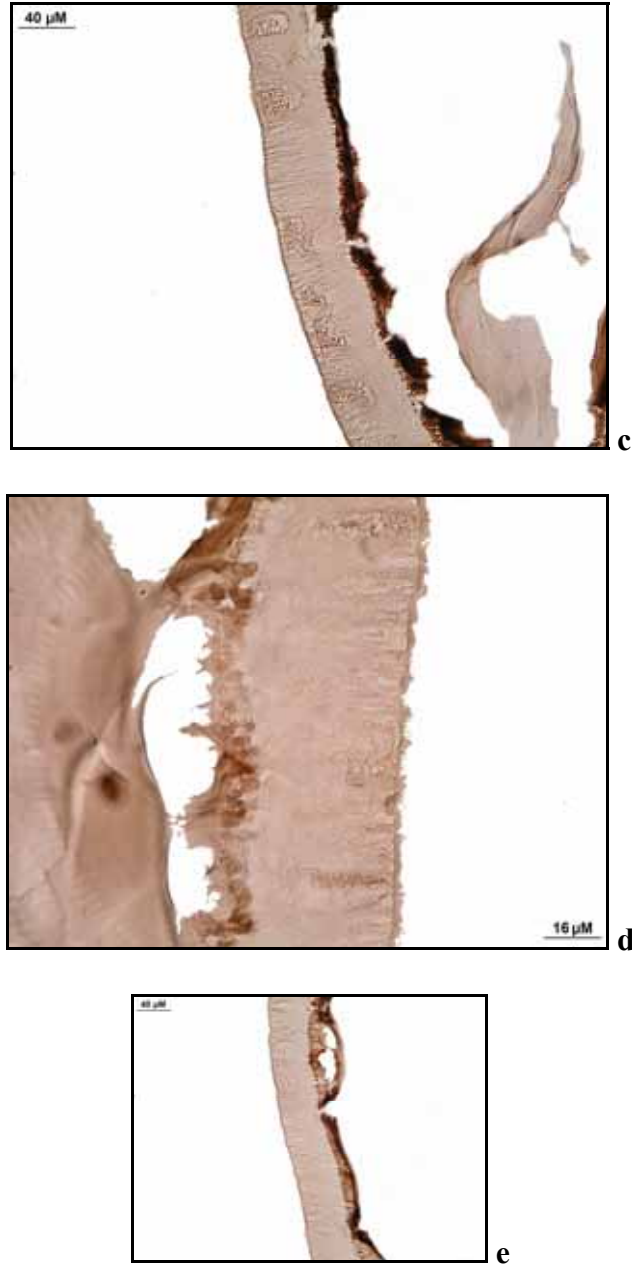
Şekil 3.39. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (Kİ), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



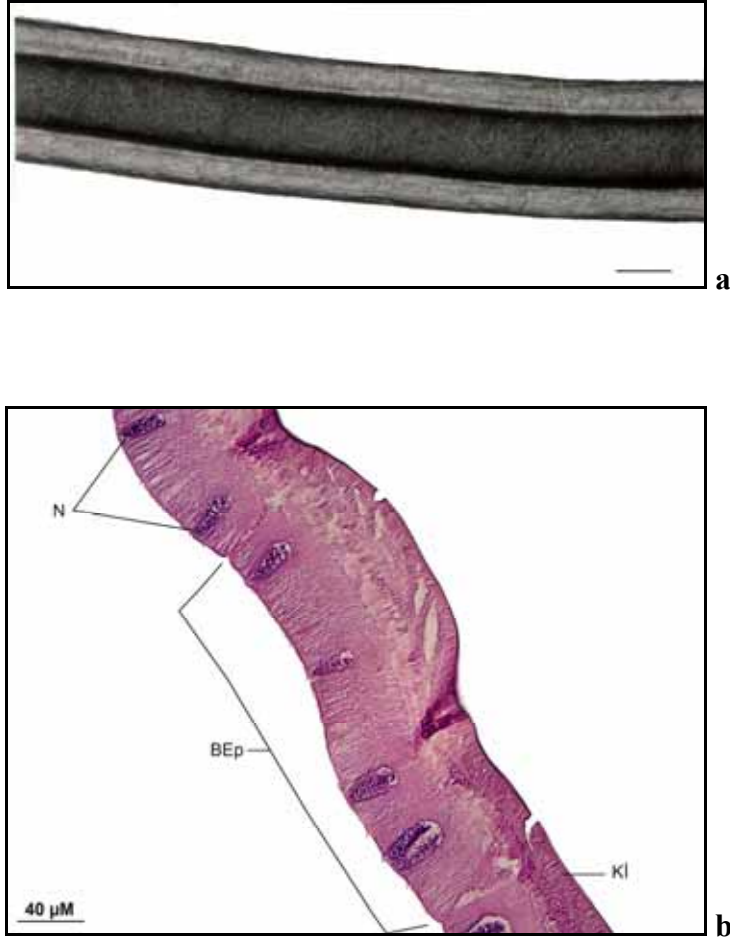
Şekil 3.39 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



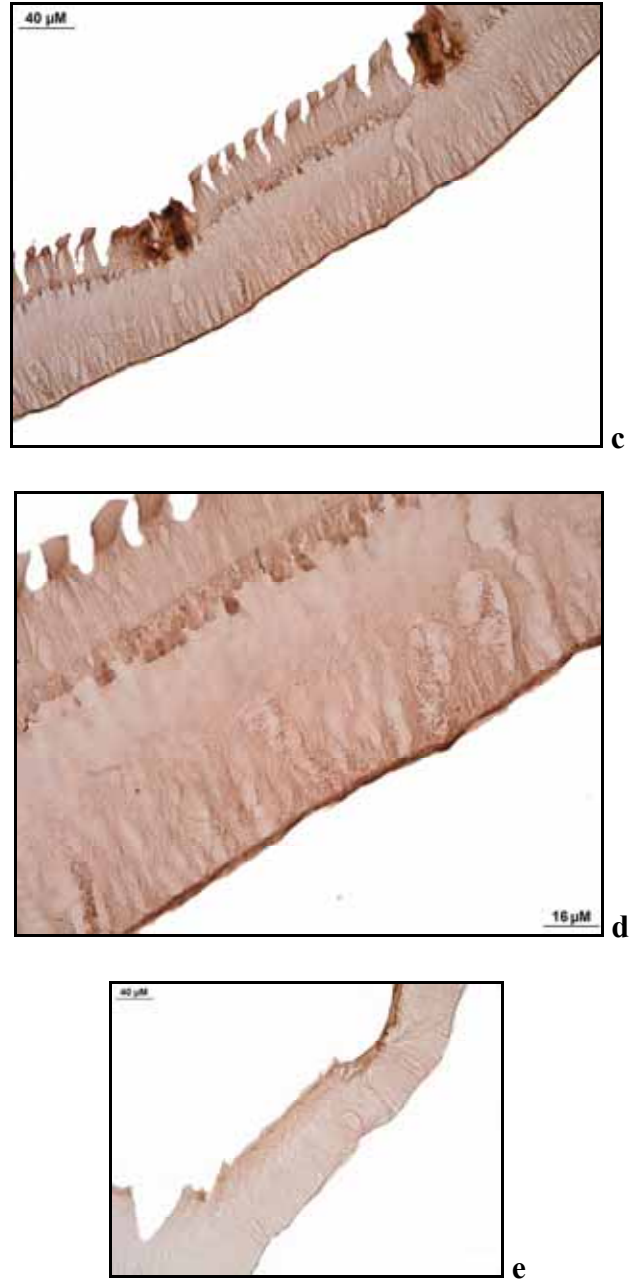
Şekil 3.40. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (KI), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



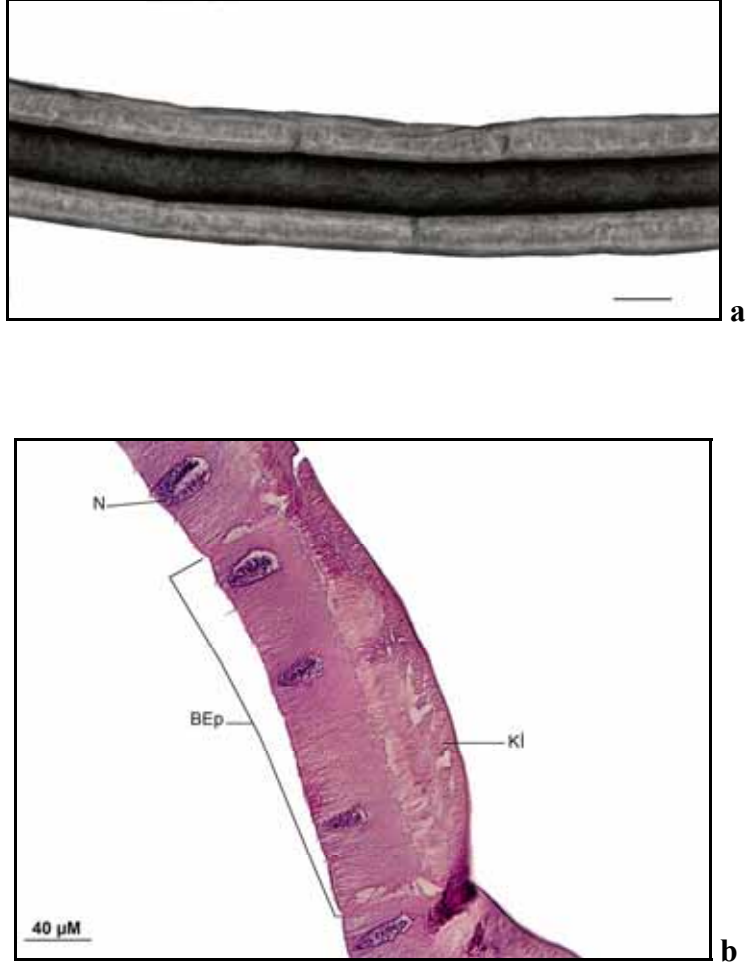
Şekil 3.40 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 11. günde ipek bezinin anterior kısmının **e)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X **e)** Negatif kontrol



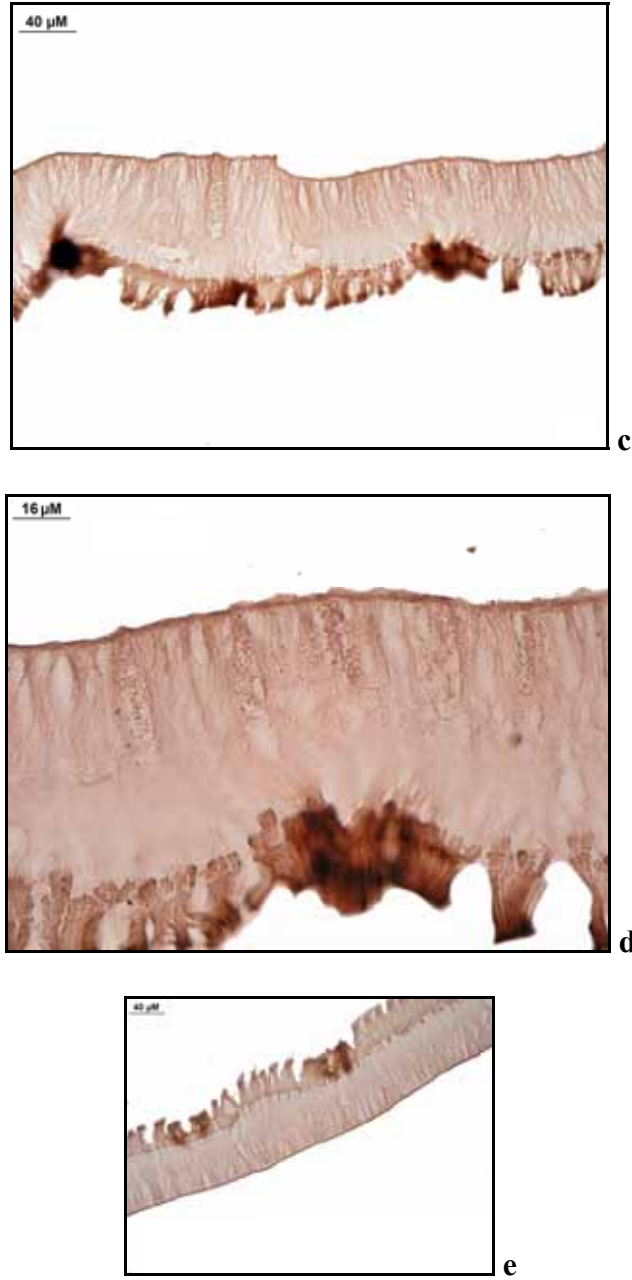
Şekil 3.41. (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (KI), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



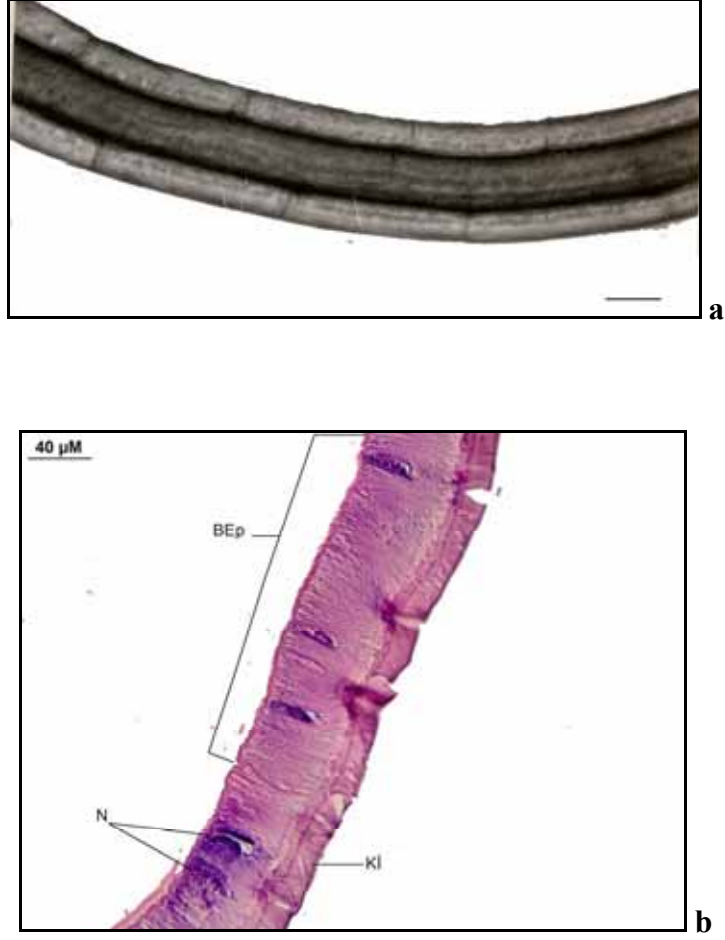
Şekil 3.41 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 12. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



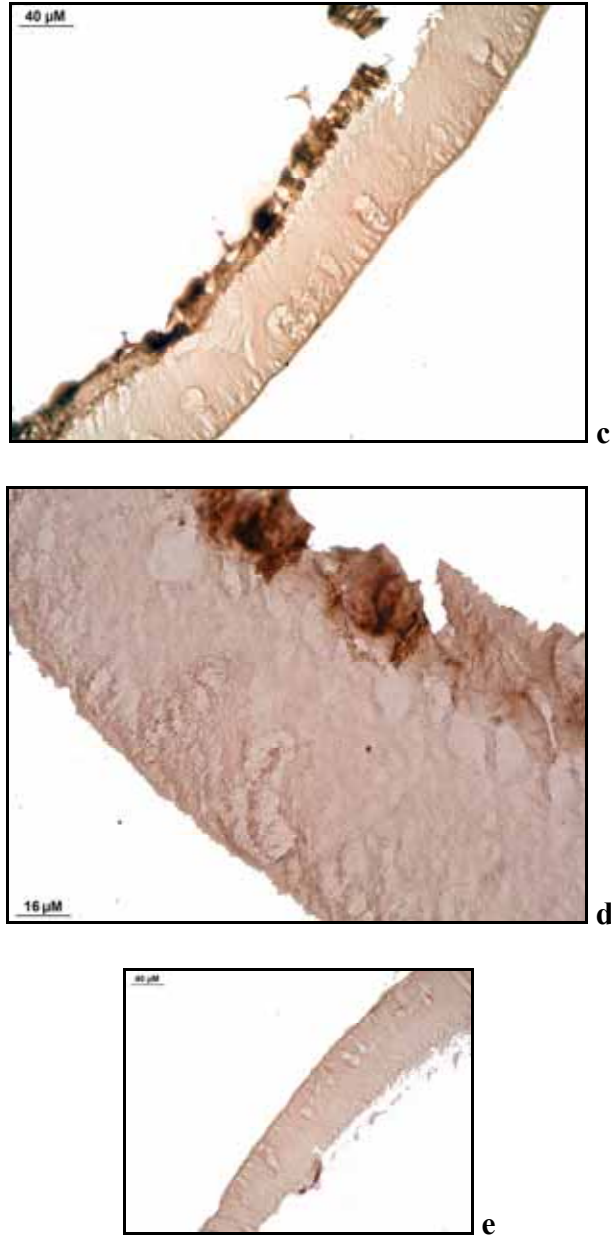
Şekil 3.42 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (KI), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm'dir.



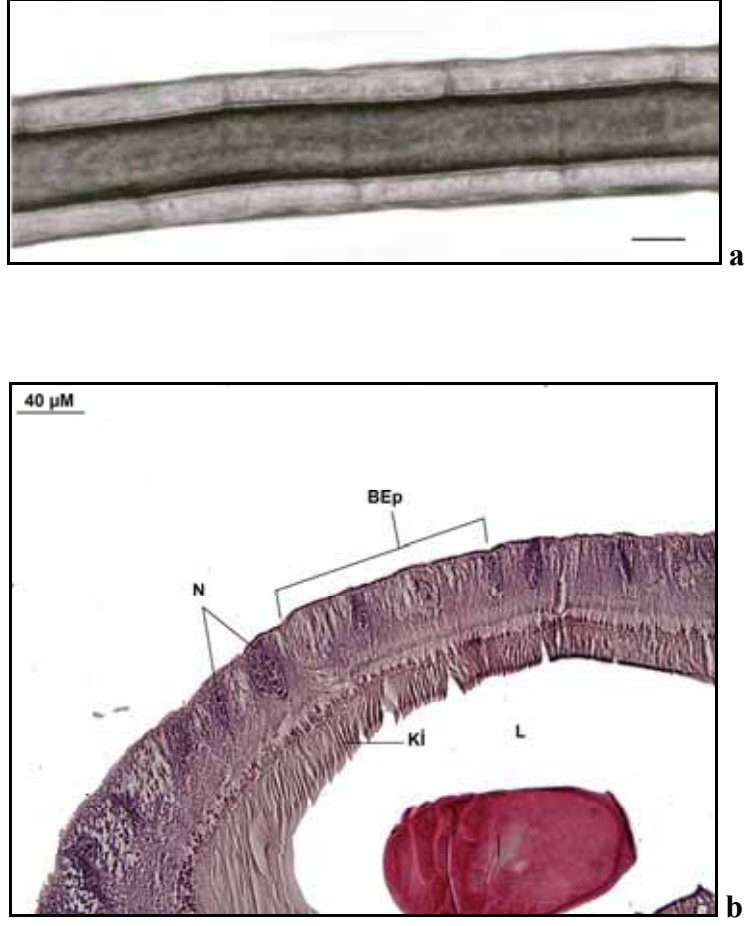
Şekil 3.42 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 13. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif Kontrol



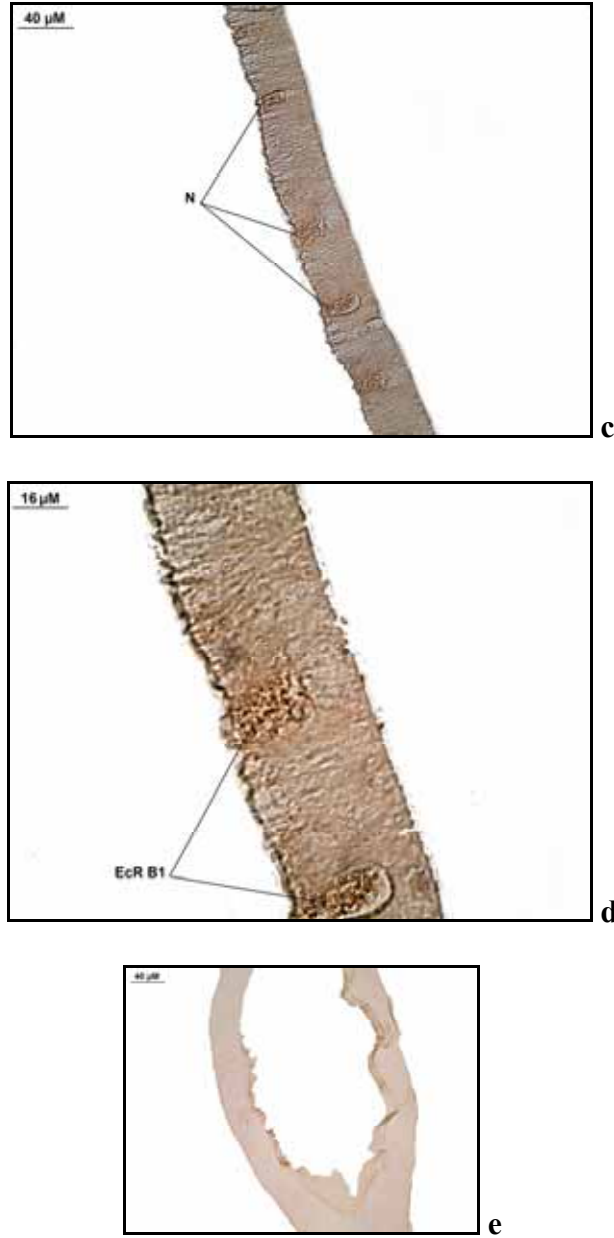
Şekil 3.43 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (KI), Nucleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



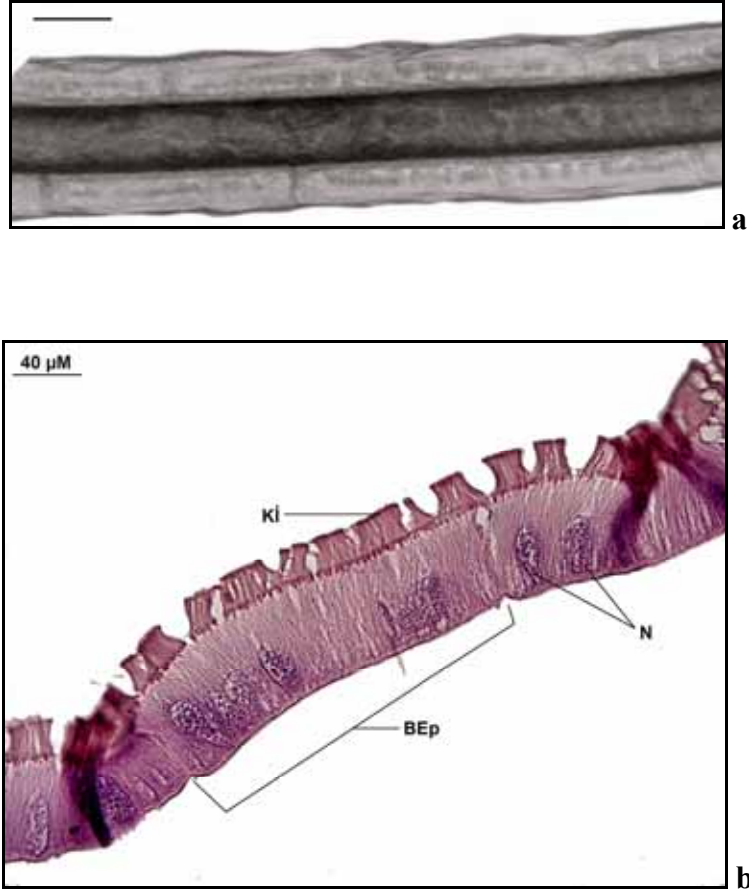
Şekil 3.43 (3.gün-10 ng) uygulama grubunda 14. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)**Negatif kontrol



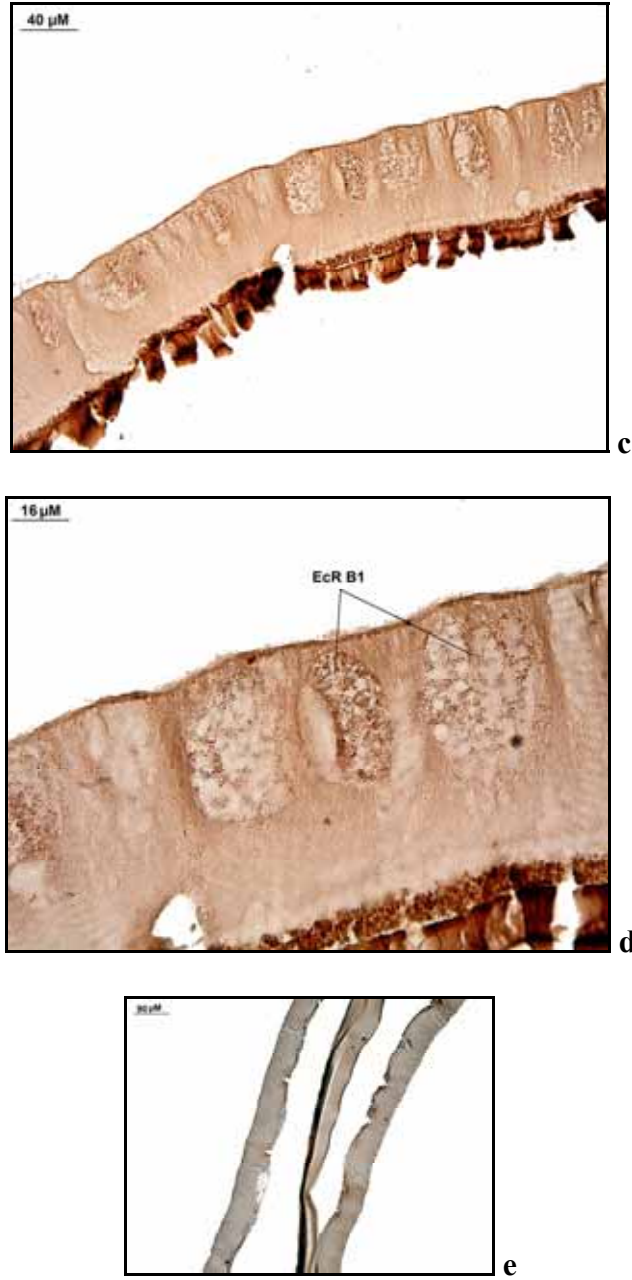
Şekil 3.44. (6.gün-1ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ). Lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



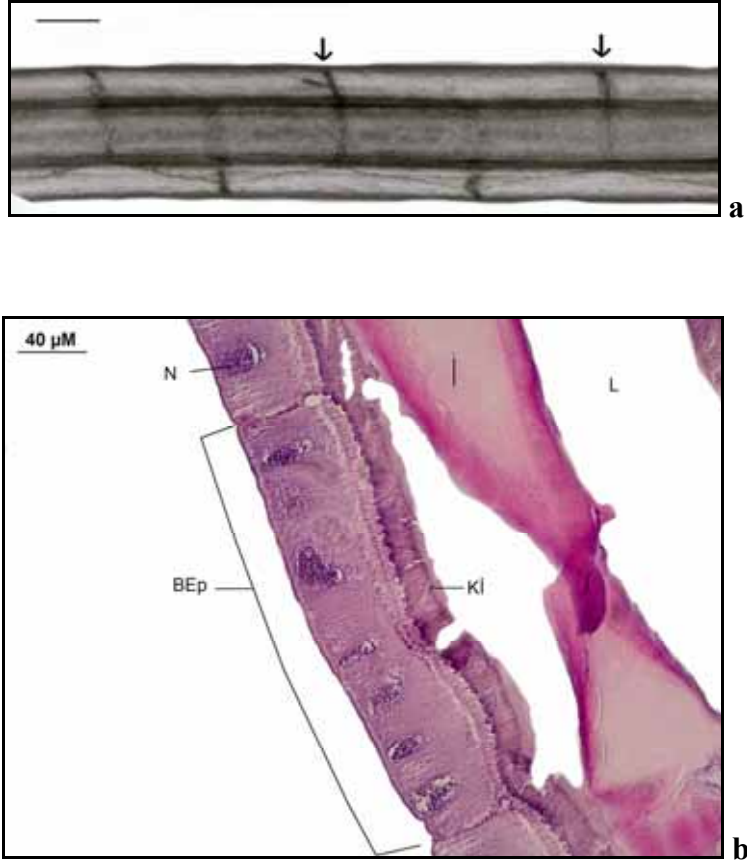
Şekil 3.44 (6.gün-1ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol. Ekdizon reseptör B1 (EcR B1), Nükleus (N).



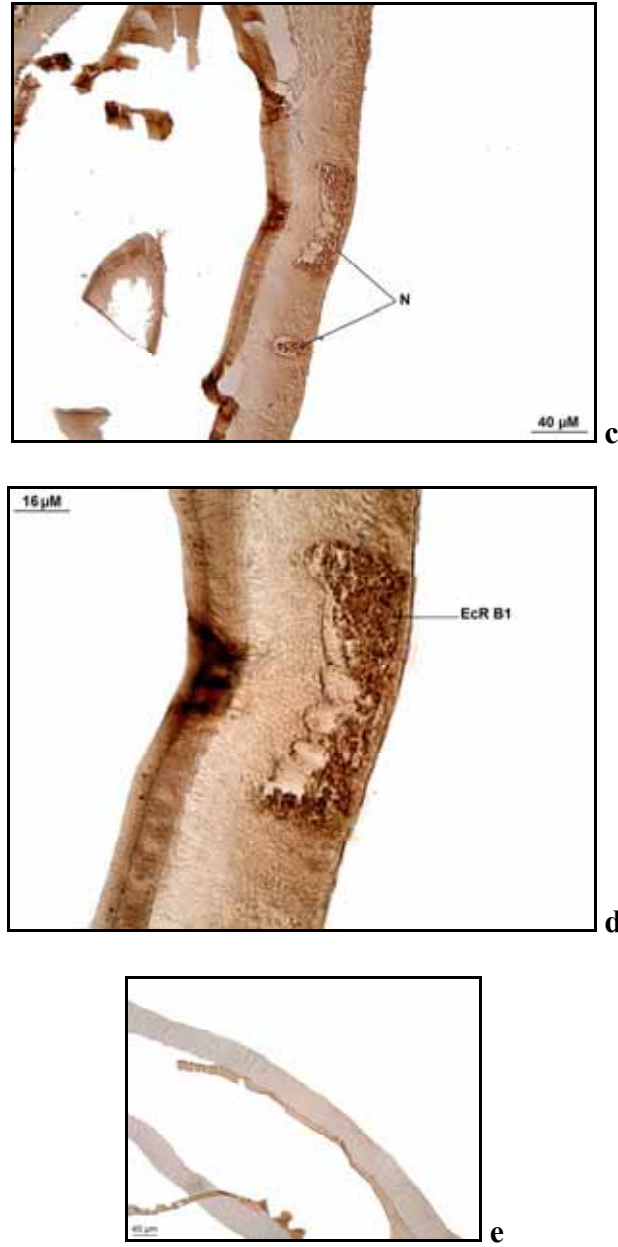
Şekil 3.45. (6.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), Kütikula İntima (KI), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



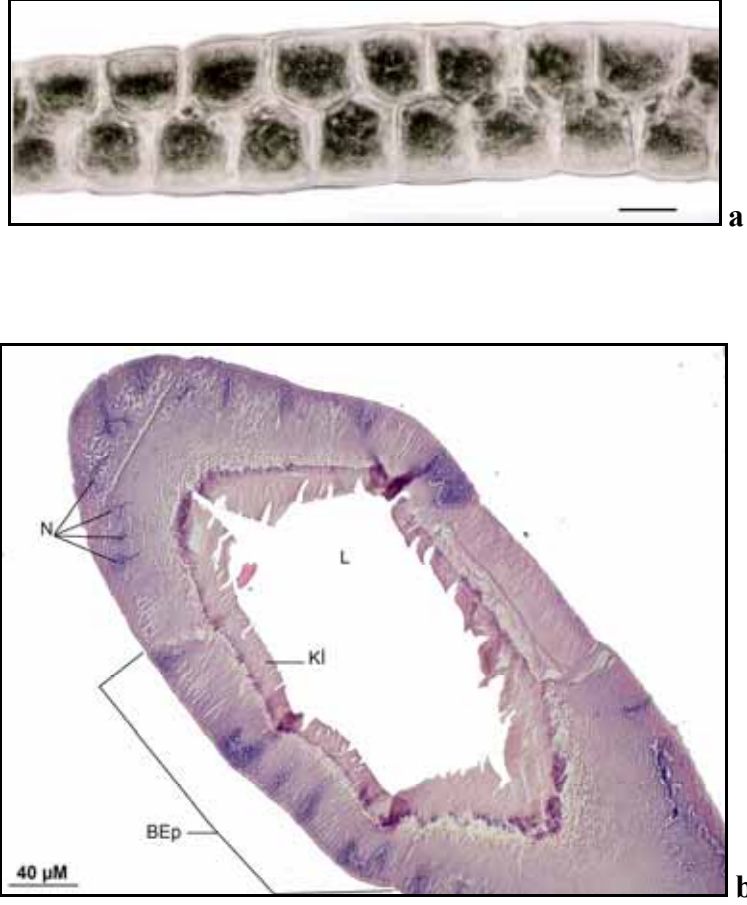
Şekil 3.45 (6.gün-1ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol. Ekdizon reseptör B1 (EcR B1).



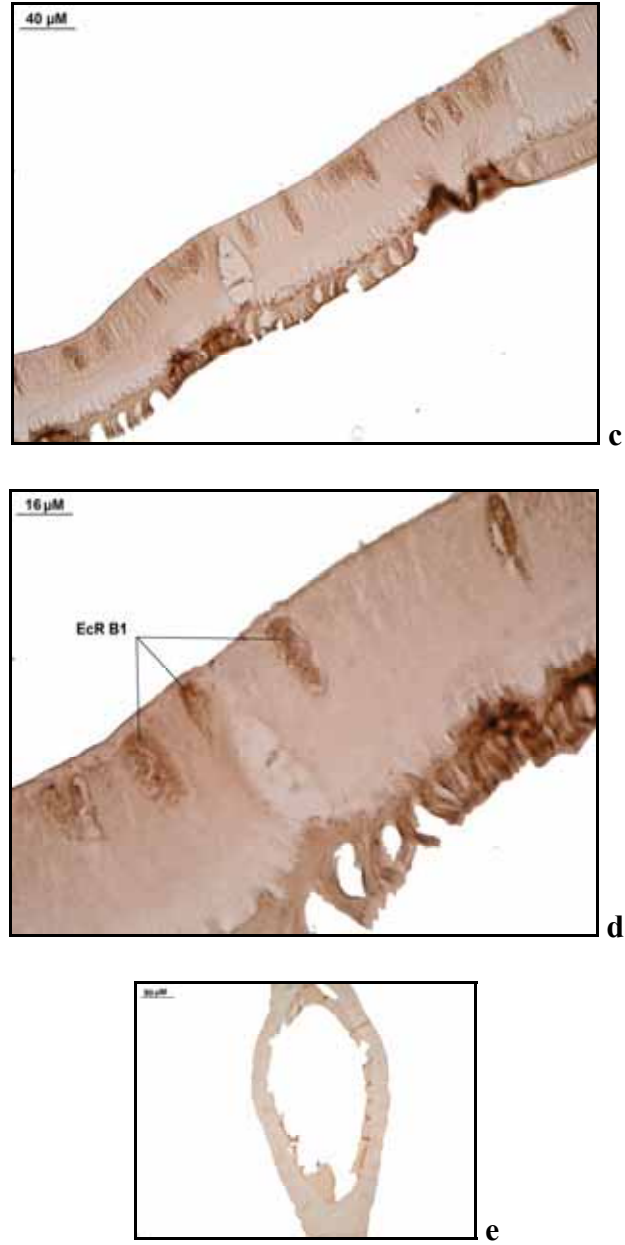
Şekil 3.46. (6.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), Kütikula İntima (Kİ). Lümen (L), Nukleus (N), Oklar hücreler arası bağlantılarda meydana gelen dejenerasyonu göstermektedir. (a) için Skala bar 100 µm'dir.



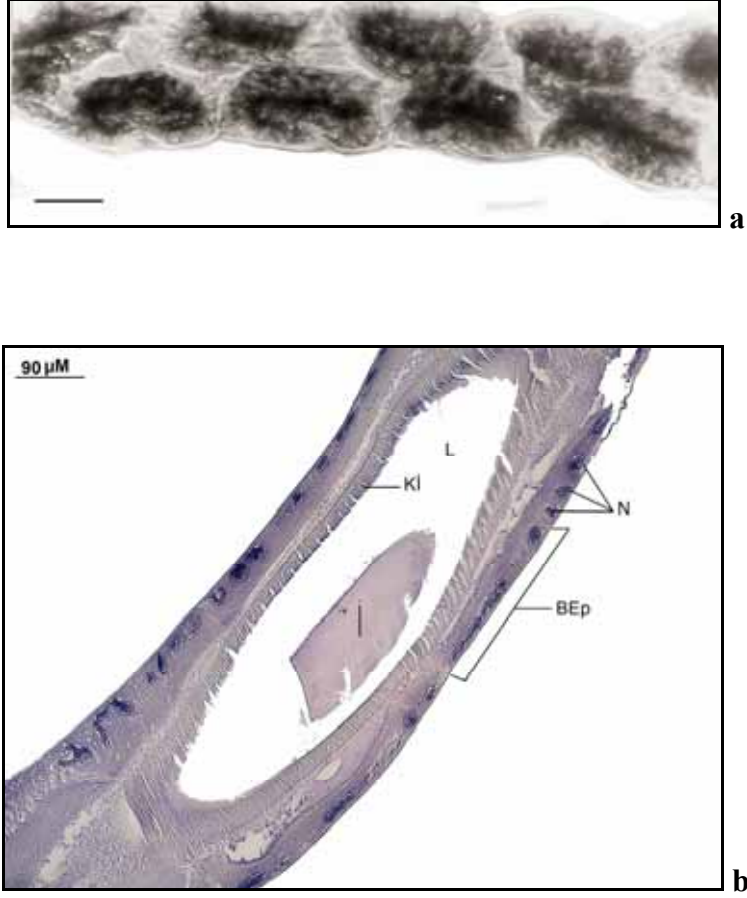
Şekil 3.46 (6.gün-1ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40x); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol. Ekdizon reseptör B1 (EcR B1), Nukleus (N).



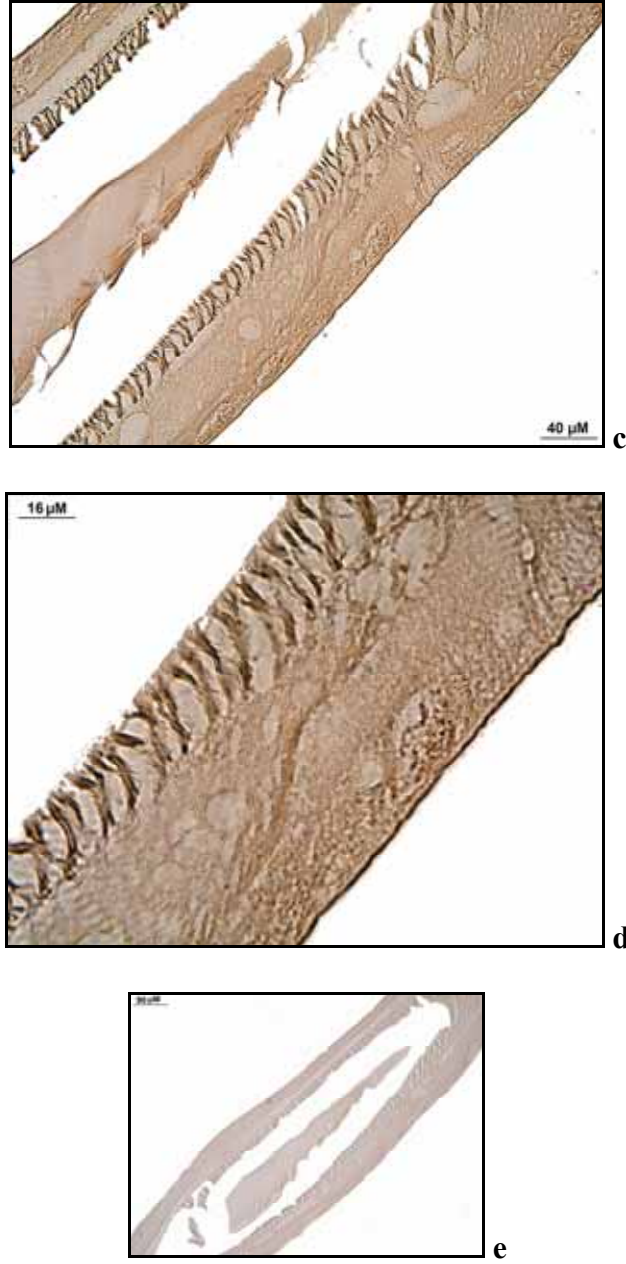
Şekil 3.47. (6.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), Kütikula İntima (Kİ), Lümen (L), Nükleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



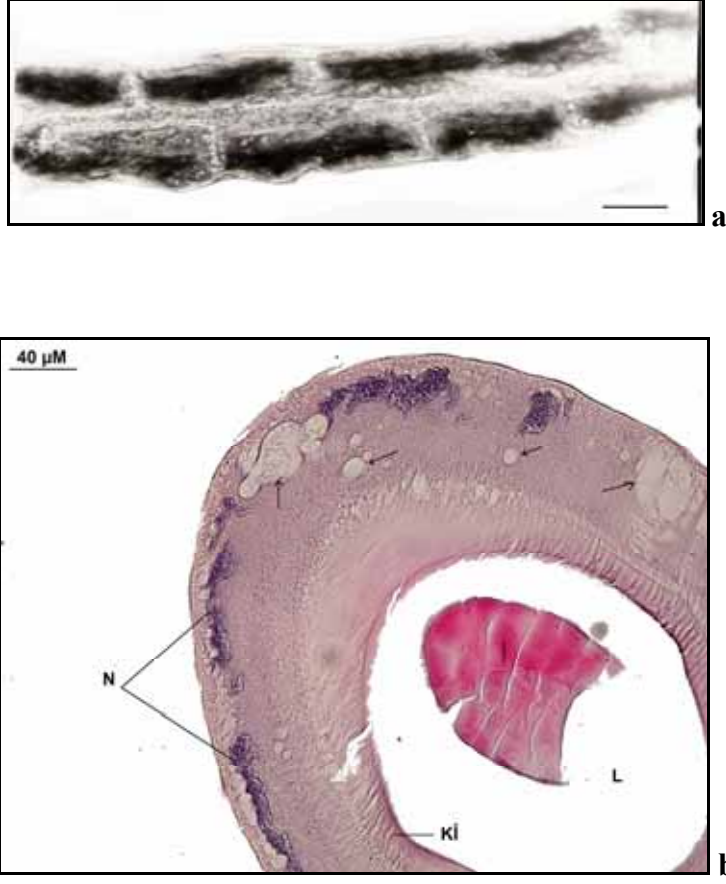
Şekil 3.47 (6.gün-1ng) uygulama grubunda 10. günde (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol. Ekdizon reseptör B1 (EcR B1).



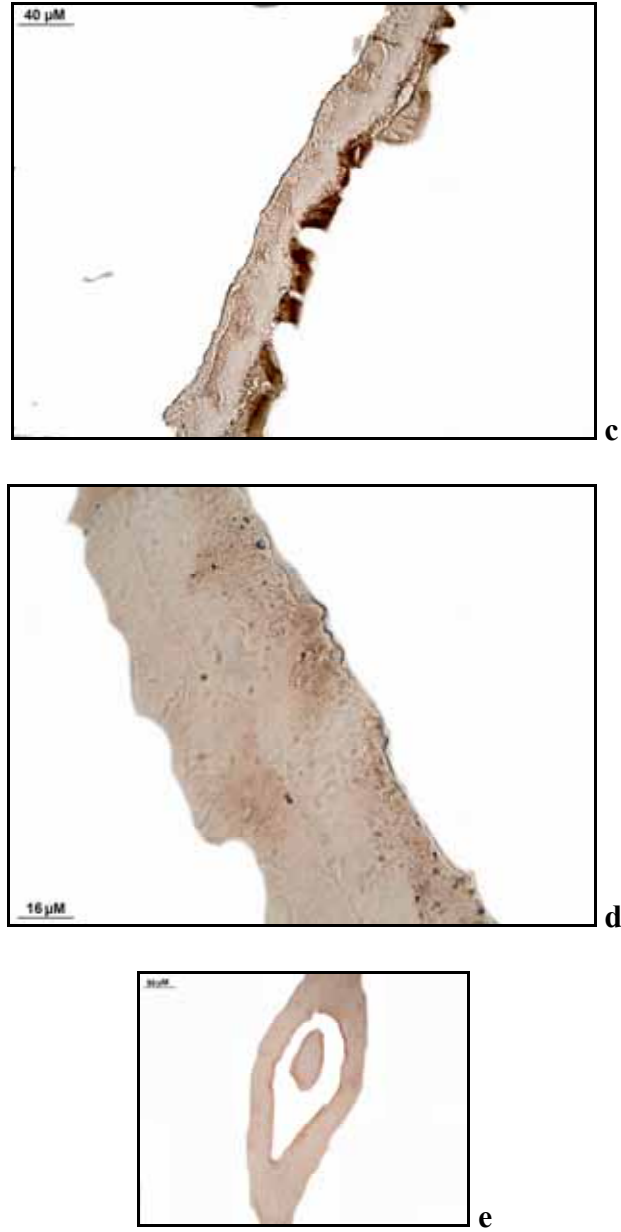
Şekil 3.48. (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 12. saatte ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem). Bez epiteli (BEp), ipek (İ), kütikula intima (Kİ). Lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm 'dir.



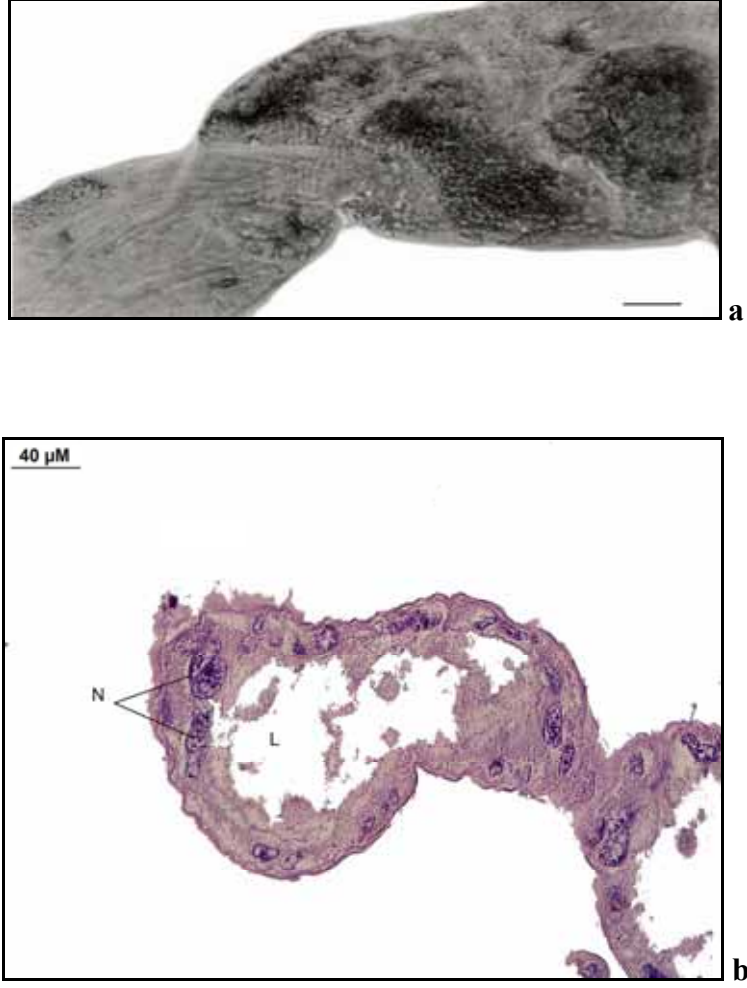
Şekil 3.48 (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 12. saatte ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi; **d)** 100X, **e)** Negatif kontrol



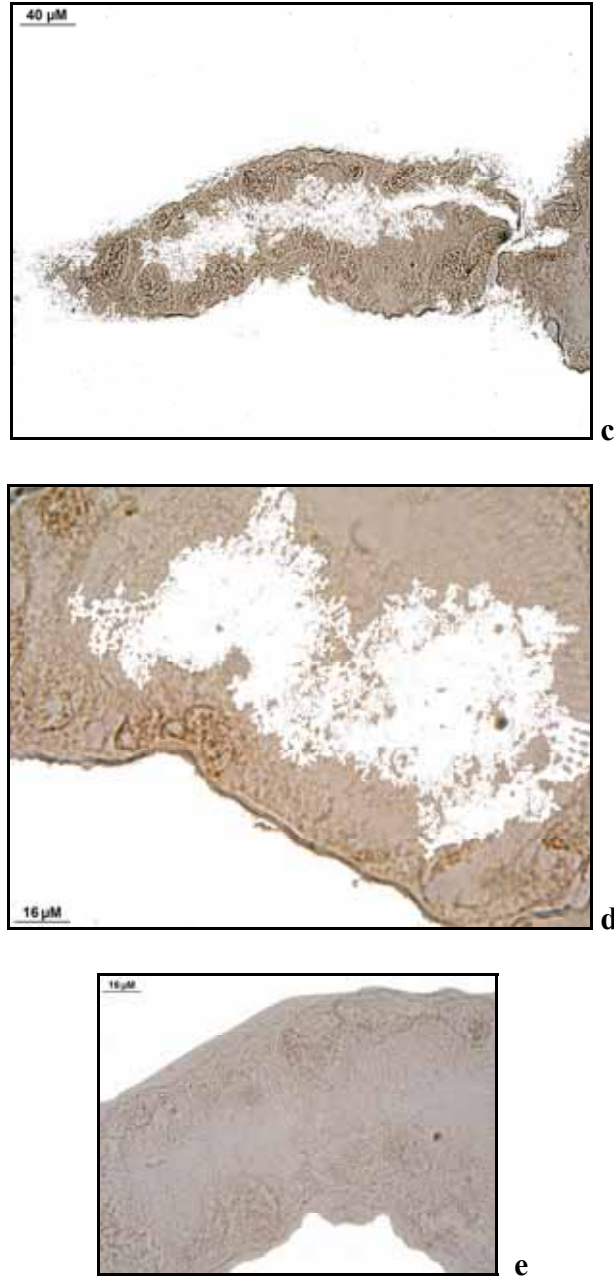
Şekil 3.49. (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 24. saatte ipek bezinin anterior kısmının **b**) Histolojik yapısı (Hem&Eosin). İpek (İ), kütikula intima (Kİ). Lümen (L), Nükleus (N). Oklar hücreler içinde meydana gelen otofajik vakuolleri göstermektedir, (a) için Skala bar 85 μm'dir.



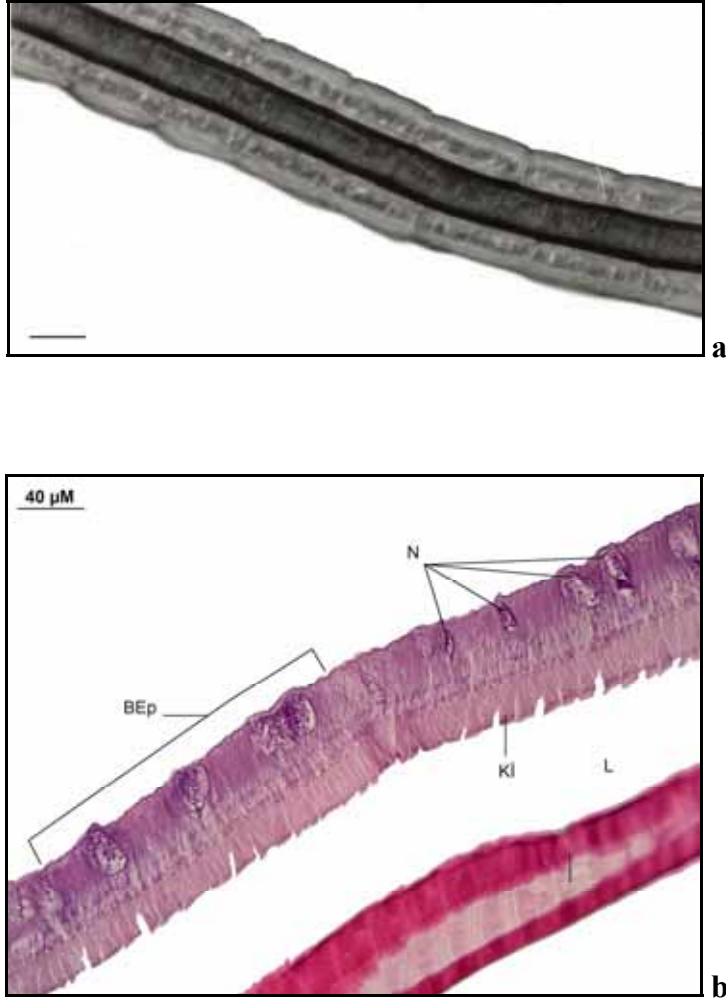
Şekil 3.49 (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 24. saatte ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)**100X; **e)** Negatif kontrol



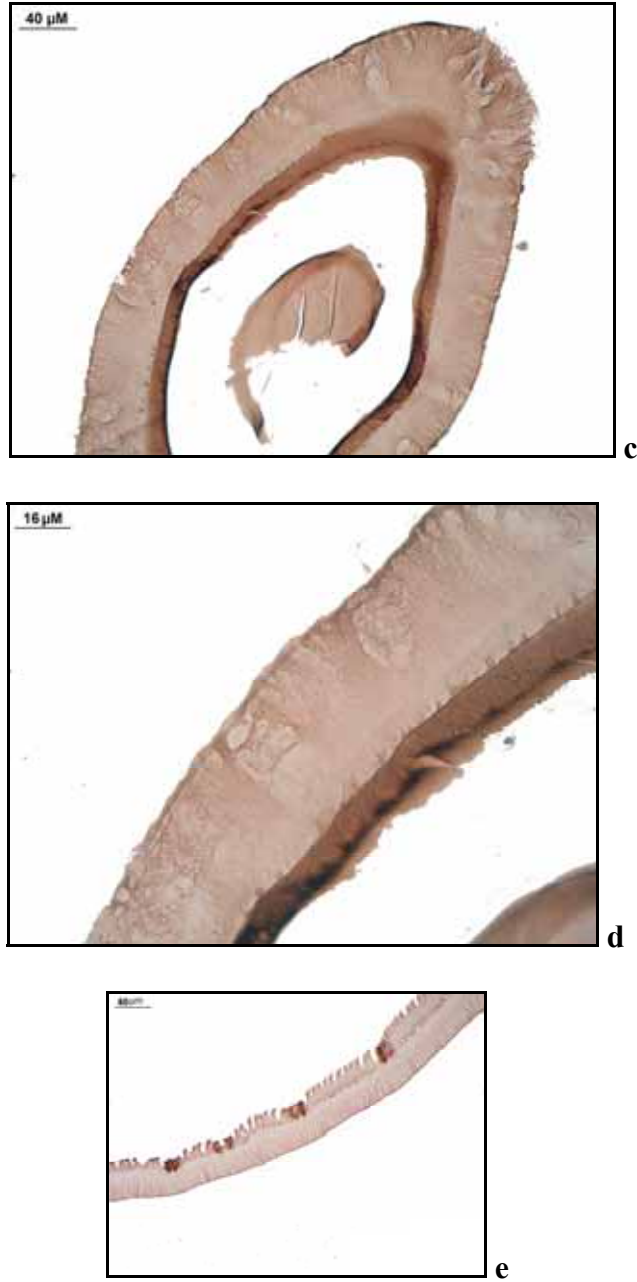
Şekil 3.50. (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 36. saatte ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Lümen (L), Nükleus (N), (a) için Skala bar 85 μm'dir



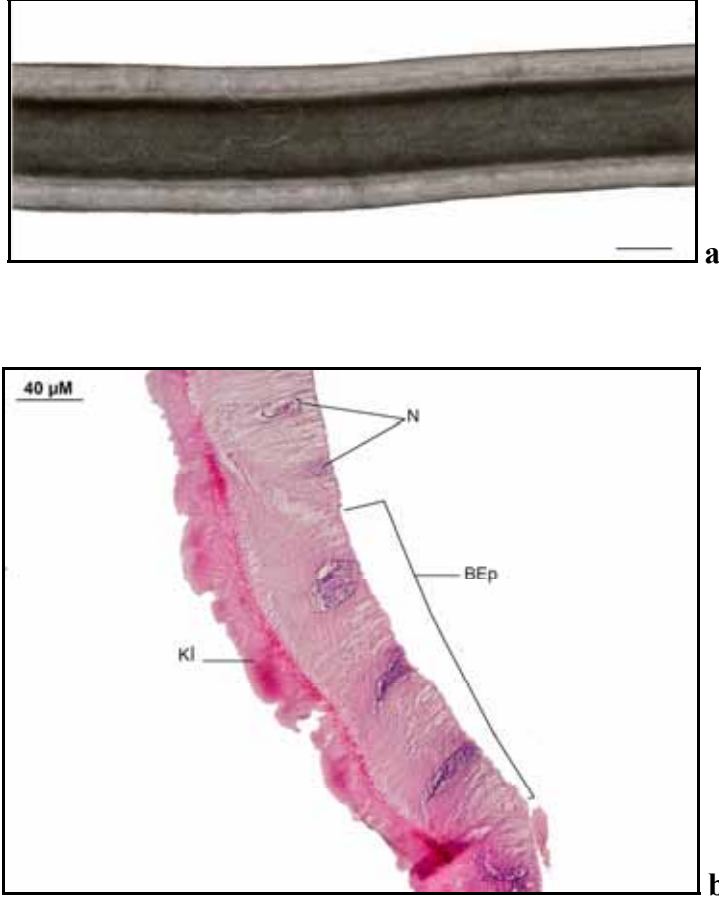
Şekil 3.50 (6.gün-1ng) uygulama grubunda pupa 36. saatte ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), **d)**100X; **e)** Negatif kontrol.



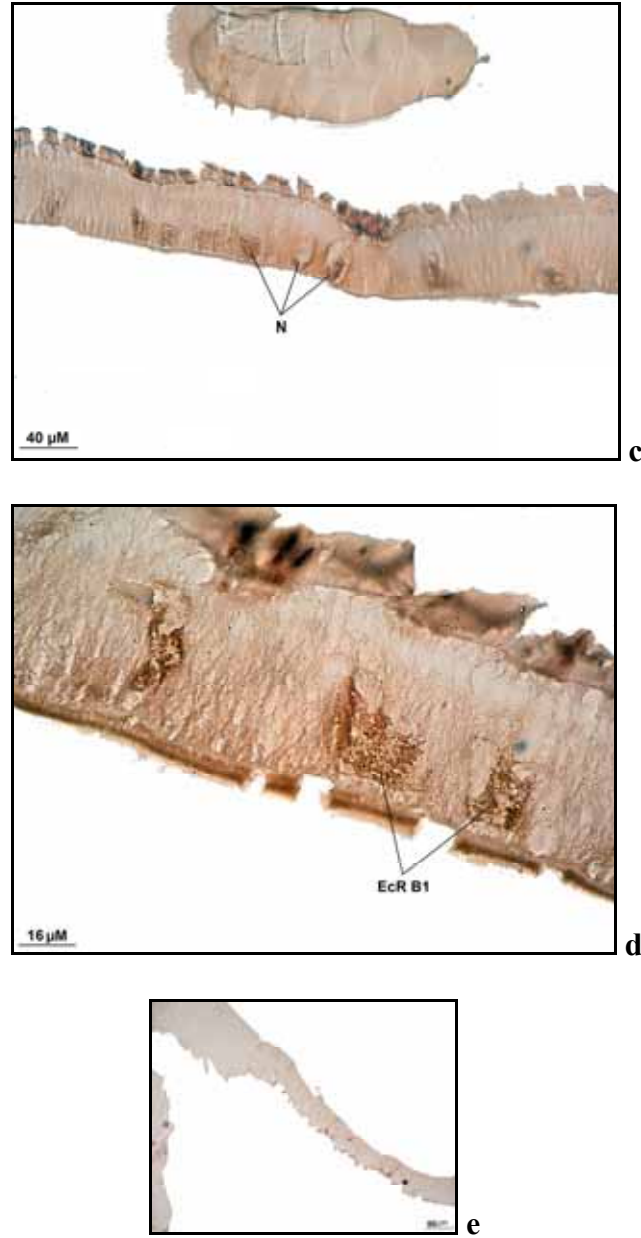
Şekil 3.51 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp),ipek (İ), kütikula intima (Kİ), lümen (L), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 μm'dir.



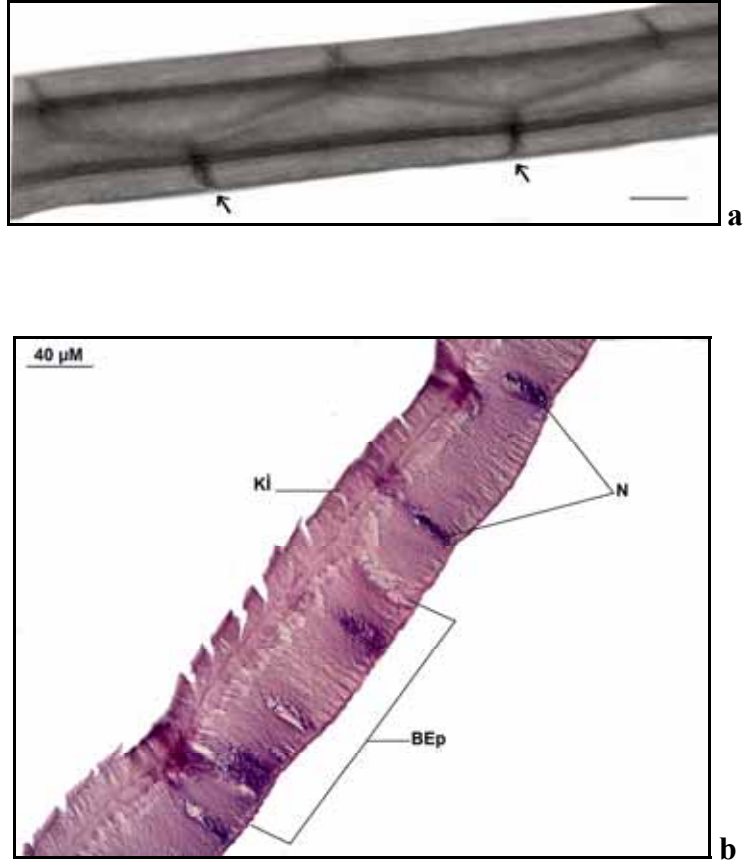
Şekil 3.51 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 7. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



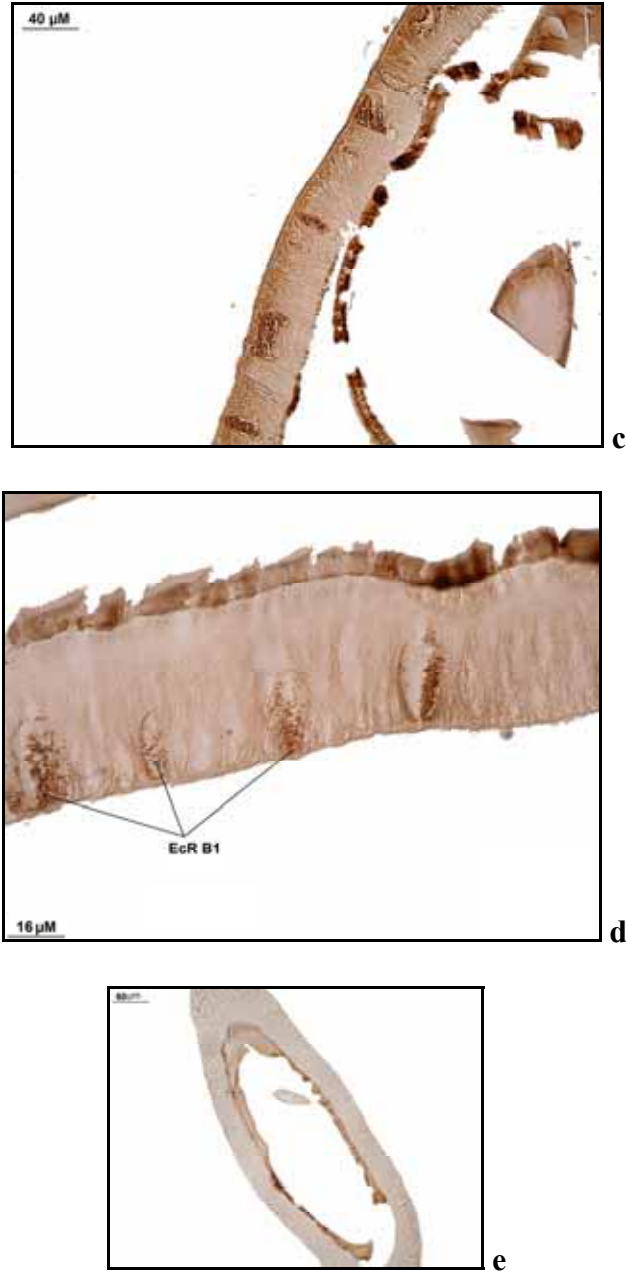
Şekil 3.52 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (Kİ), Nucleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



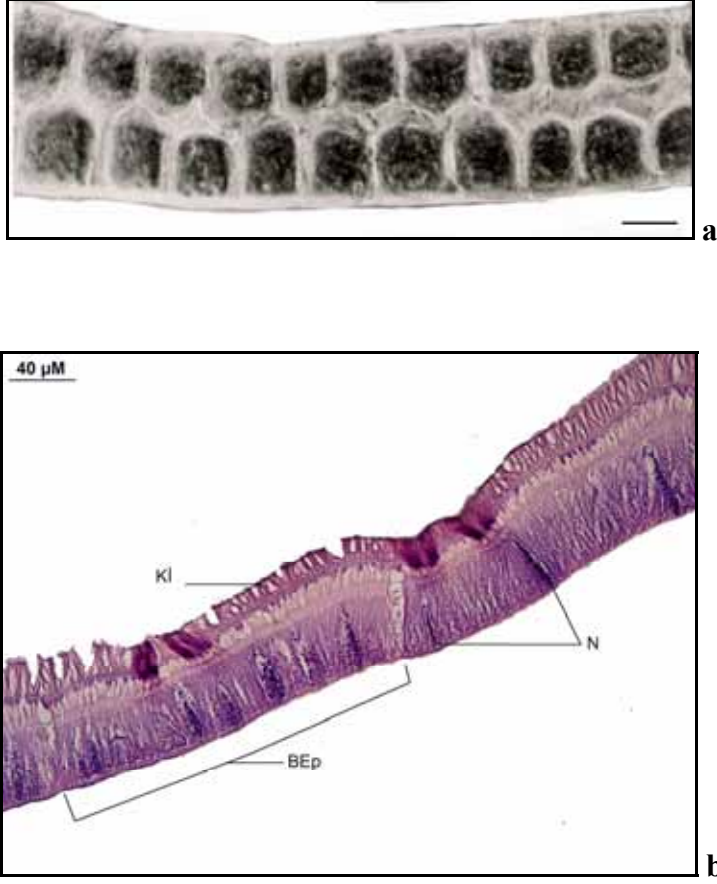
Şekil 3.52 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 8. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol. Ekdizon reseptör B1 (EcR B1), Nukleus (N).



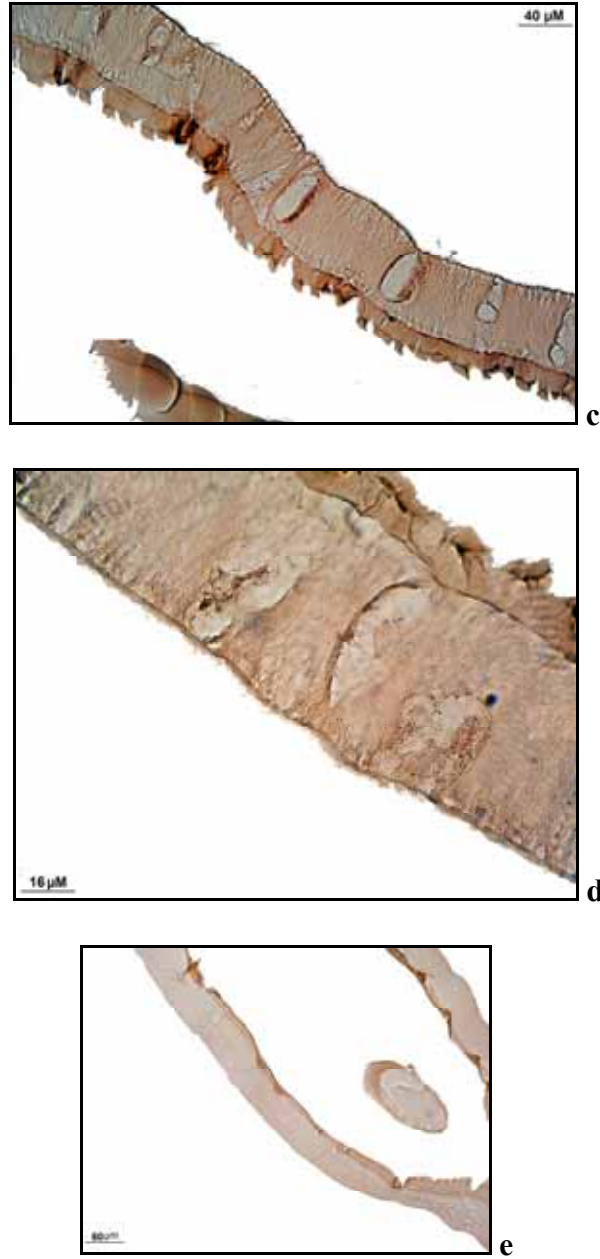
Şekil 3.53 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (Kİ), Nukleus (N), Oklar hücreler arası bağlantılarda meydana gelen dejenerasyonu göstermektedir. (a) için Skala bar 100 μm'dir.



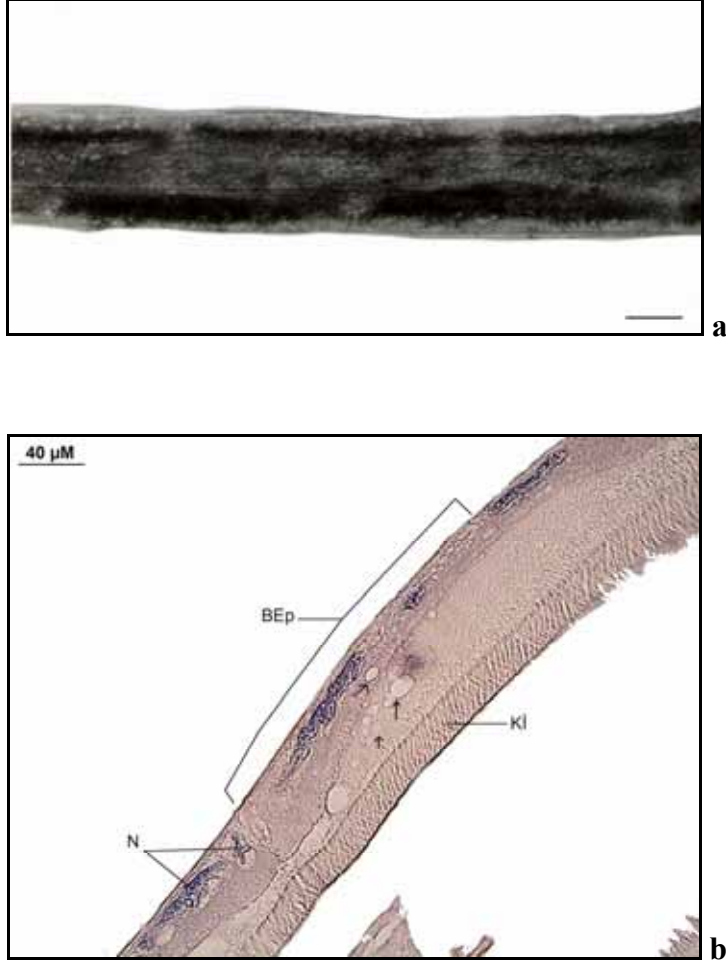
Şekil 3.53 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 9. günde ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol. Ekdizon reseptör B1 (EcR B1)



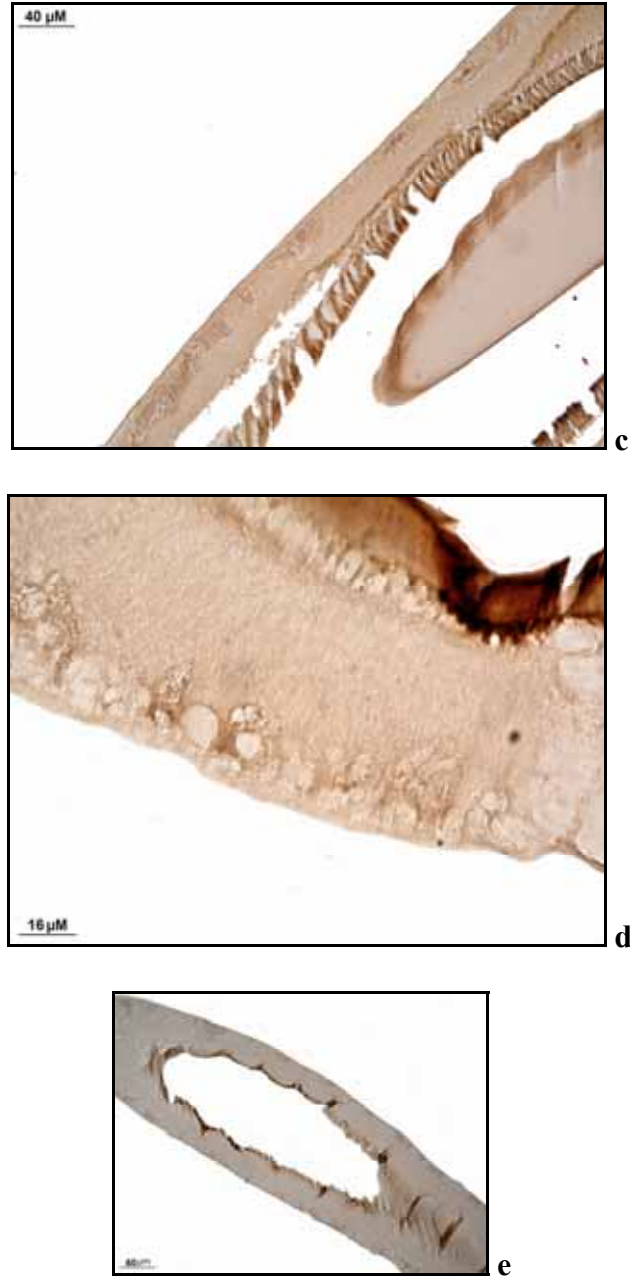
Şekil 3.54 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (Kİ), Nukleus (N), (a) için Skala bar 100 µm'dir.



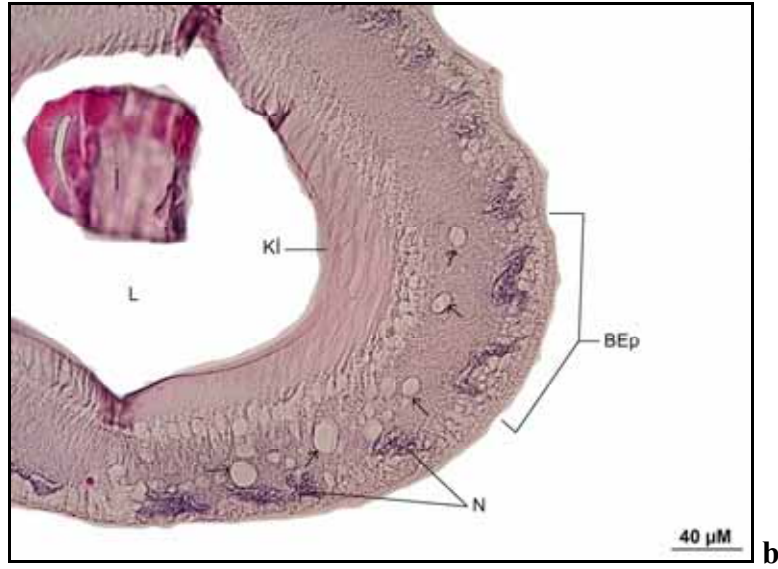
Şekil 3.54 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda 10. günde (pupalaşma) ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol



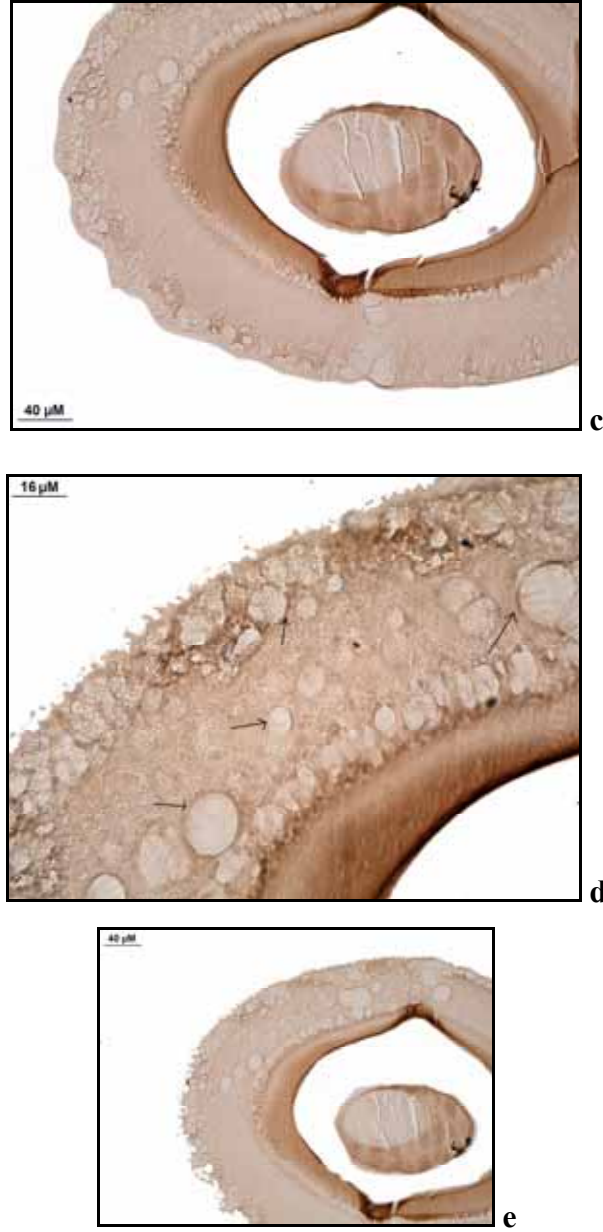
Şekil 3.55 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 12. saat ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Bez epiteli (BEp), kütikula intima (KI), Nukleus (N), oklar otofajik vakuolleri göstermektedir, (a) için Skala bar 100 µm'dir.



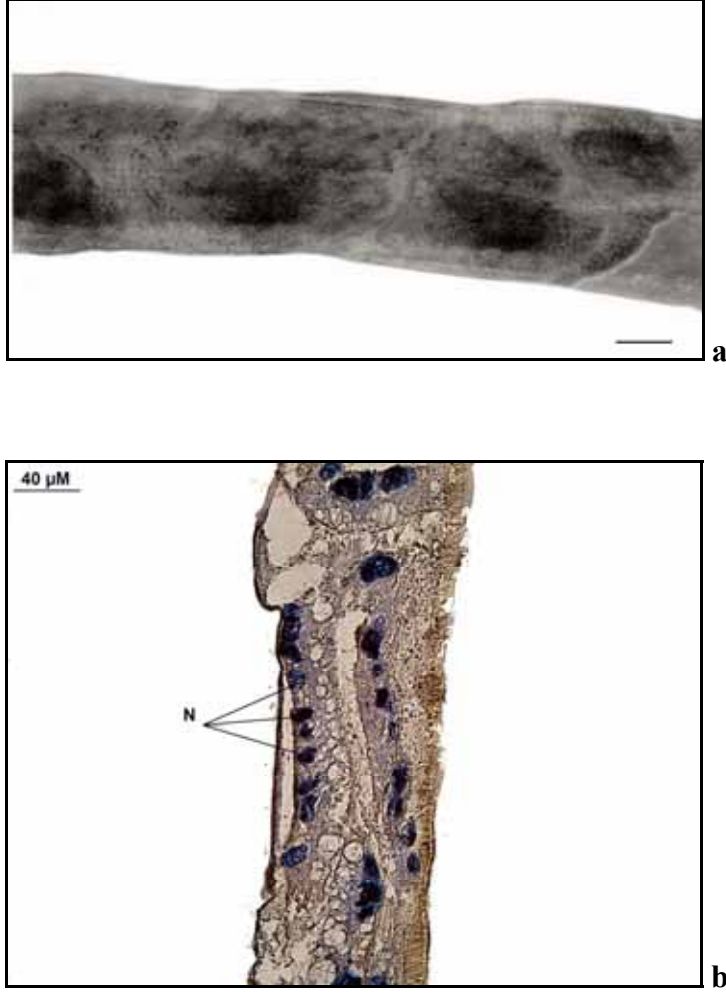
Şekil 3.55 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 12. saatte ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X); **d)** 100X; **e)** Negatif kontrol.



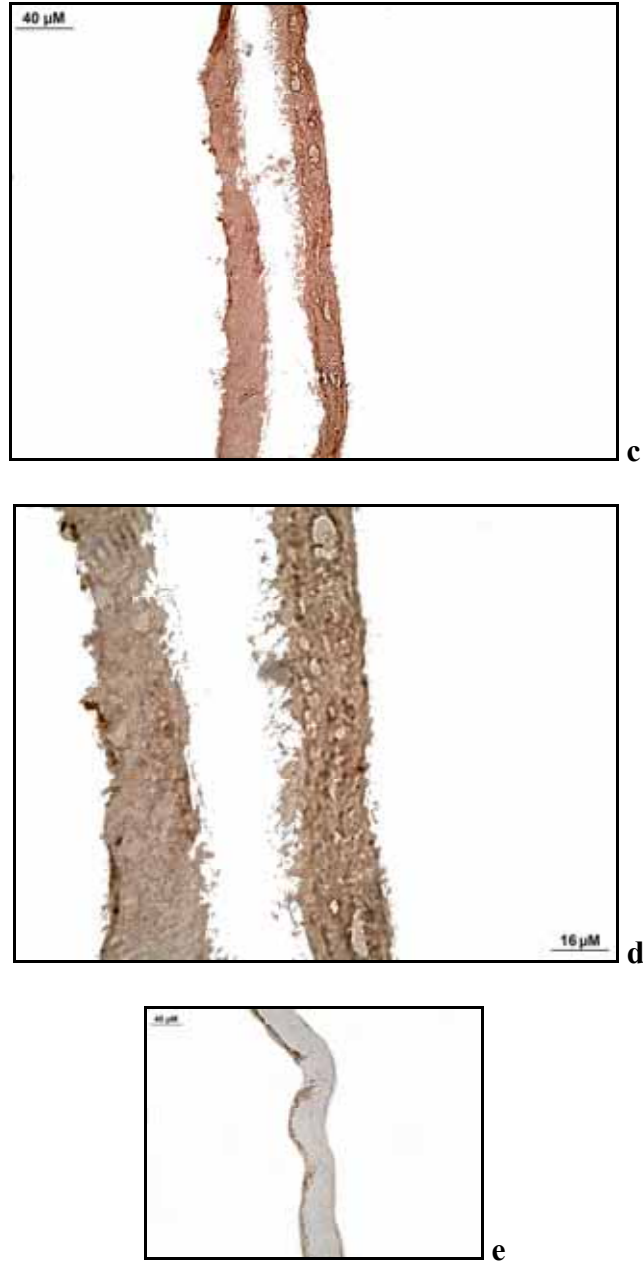
Şekil 3.56 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 24. saat ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). İpek (İ); Kütikula intima (Kİ), Lümen (L); Nükleus (N), oklar otofajik vakuolleri göstermektedir, (a) için Skala bar 85 μm 'dir.



Şekil 3.56 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 24. saatte ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), **d)** 100X, **e)** Negatif kontrol. Oklar otofajik vakuollerini göstermektedir.



Şekil 3.57 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 36. saat ipek bezinin anterior kısmının **a)** Faz kontrast mikroskobu görünümü, **b)** Histolojik yapısı (Hem&Eosin). Nucleus (N), (a) için Skala bar 85 µm'dir.

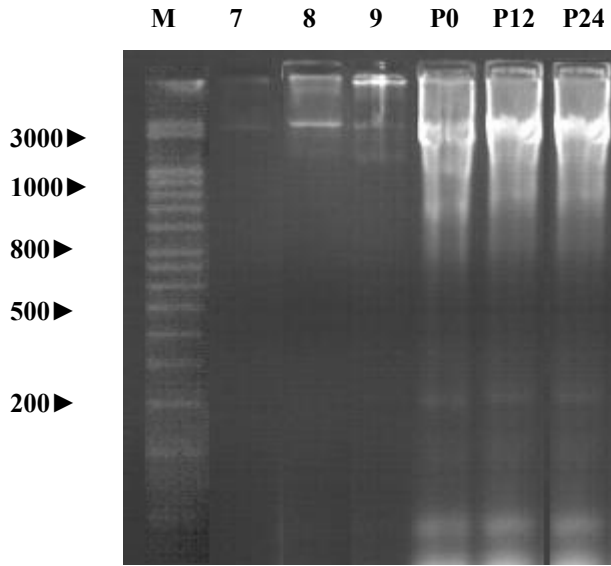


Şekil 3.57 (6.gün-10 ng) uygulama grubunda pupa 36. saatte ipek bezinin anterior kısmının **c)** EcR B1'in immunohistokimyasal belirlenmesi (40X), **d)** 100X, **e)** Negatif kontrol.

3.5 DNA Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları

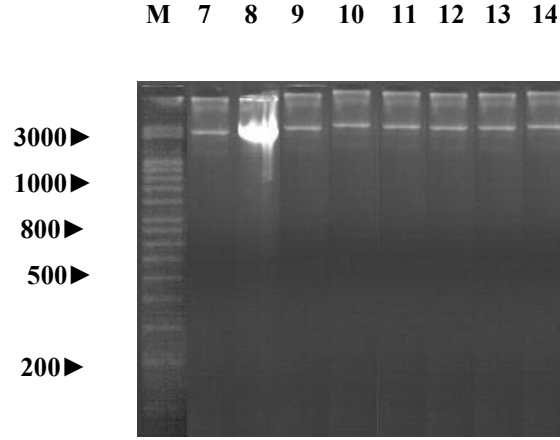
Kontrol ve uygulama gruplarından alınan ipek bezlerinin anterior kısımlarına ait DNA'lar fenol-kloroform ekstraksiyon (Sambrook et.,all., 1979) yöntemine göre elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir. DNA'nın 180-200 baz çiftlik kırıklara ayrılması, programlanmış hücre ölümünün temel biyokimyasal işaretlerinden biridir.

Kontrol grubundan elde edilen bulgularda 5. larval evrenin 7., 8., ve 9. günlerinde DNA'nın bozulmadan kaldığı görülmüş ve herhangi bir kırık belirlenmemiştir. Pupalaşmanın meydana geldiği 5. larval evrenin 10. gününden itibaren DNA'da programlanmış hücre ölümüne spesifik kırıkların oluştuğu görülmüştür (Şekil 3.58).

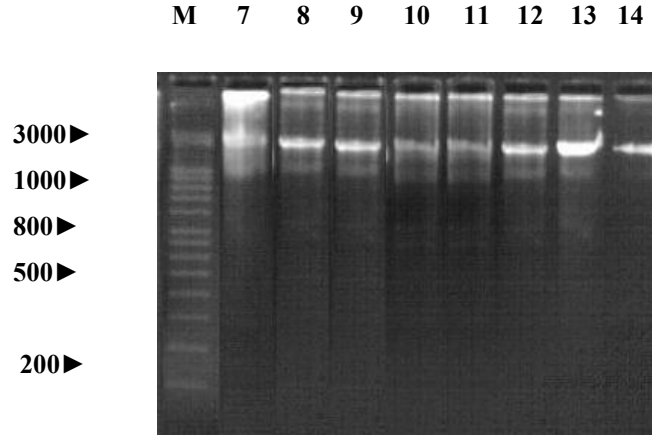


Şekil 3.58 Kontrol Grubu DNA Jel elektroforezi. Marker (M), 5.larval evrenin 7. günü (7), 8. günü (8), 9. günü (9), pupa 0. gün (P0), pupa 12. saat (P12), pupa 24. saat (P24). Solda gösterilen sayılar baz çiftlerini göstermektedir.

0.günde 1 ve 10 ng fenoxycarb uygulaması yapılan gruplarda 7. günden 14. güne kadar DNA'nın bozulmadan kaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.59, 3.60). Bu gruplarda programlanmış hücre ölümünün meydana gelmediği histolojik bulgularla da desteklenmiştir.

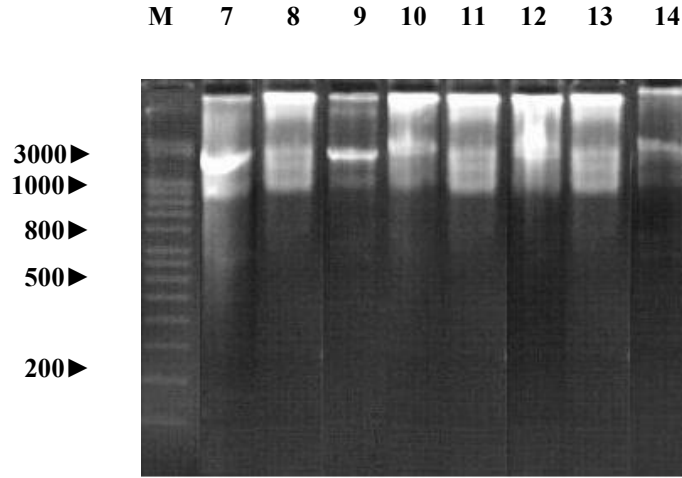


Şekil 3.59. 0. gün 1 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi. Marker (M), 5.larval evrenin 7. günü (7), 8. günü (8), 9. günü (9), 10. günü (10), 11. günü (11), 12. günü (12), 13. günü (13), 14. günü (14). Bu grup hayvanlar pupal safhaya geçememiştir. Solda gösterilen sayılar baz çiftlerini göstermektedir.

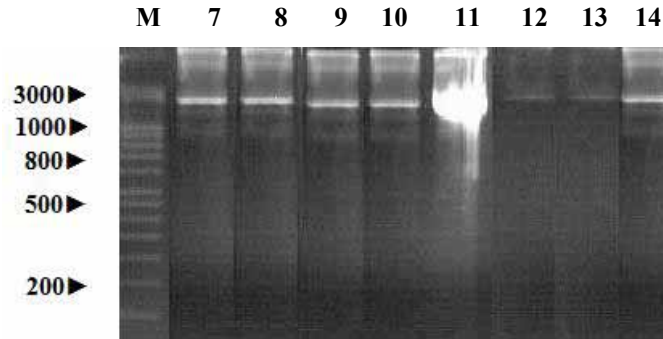


Şekil 3.60 5. larval evrenin 0. günü 10 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi. Marker (M), 5.larval evrenin 7. günü (7), 8. günü (8), 9. günü (9), 10. günü (10), 11. günü (11), 12. günü (12), 13. günü (13), 14. günü (14). Bu grup hayvanlar pupal safhaya geçememiştir. Solda gösterilen sayılar baz çiftlerini göstermektedir.

3. günde 1 ve 10 ng fenoxycarb uygulaması yapılan gruplardan elde edilen morfolojik bulgular programlanmış hücre ölümünün bu uygulama grubu hayvanlarında meydana gelmediği yönündeydi. Yapılan DNA elektroforezi denemeleri sonucunda DNA'nın bu grup hayvanların ipek bezlerinin anterior kısmında herhangi bir kırıklı yapı göstermediği belirlenmiş; böylece biyokimyasal olarak da programlanmış hücre ölümünün meydana gelmediği gösterilmiştir (Şekil 3.61, 3.62).



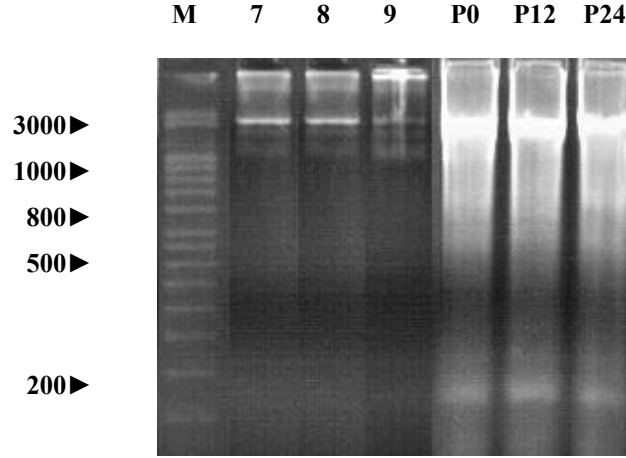
Şekil 3.61 5. larval evrenin 3. günü 1 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi. Marker (M), 5.larval evrenin 7. günü (7), 8. günü (8), 9. günü (9), 10. günü (10), 11. günü (11), 12. günü (12), 13. günü (13), 14. günü (14). Bu grup hayvanlar pupal safhaya geçememiştir. Solda gösterilen sayılar baz çiftlerini göstermektedir.



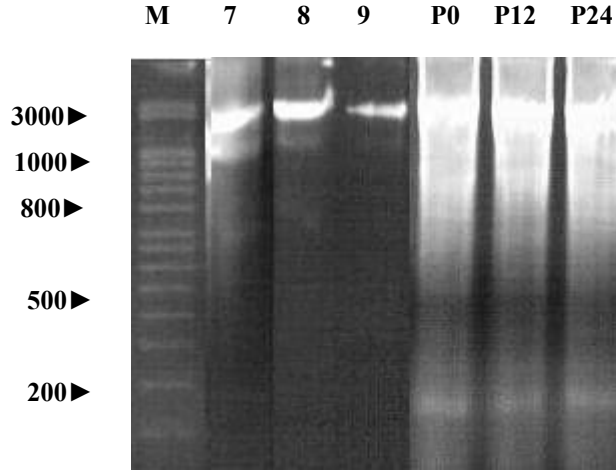
Şekil 3.62 5. larval evrenin 3. günü 10 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi. Marker (M), 5.larval evrenin 7. günü (7), 8. günü (8), 9. günü (9), 10. günü (10), 11. günü (11), 12. günü (12), 13. günü (13), 14. günü (14). Bu grup hayvanlar pupal safhaya geçememiştir. Solda gösterilen sayılar baz çiftlerini göstermektedir.

6. günde 1 ve 10 ng uygulama yapılan gruplarda DNA elektroforezlerinden elde edilen sonuç kontrol grubuyla aynı olmuştur. Bu uygulama grubu hayvanlarından elde edilen ipek bezlerinin anterior kısımlarına ait DNA'nın pupalaşmanın meydana geldiği 10. günden itibaren

programlanmış hücre ölümünün biyokimyasal göstergesi olan kırıklı yapıyı gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.63, 3.64).



Şekil 3.63 5. larval evrenin 6. günü 1 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi. Marker (M), 5.larval evrenin 7. günü (7), 8. günü (8), 9. günü (9), pupalaşma (P0), pupal safhanın 12. saati (P12), pupal safhanın 24. saati(P24). Solda gösterilen sayılar baz çiftlerini göstermektedir.



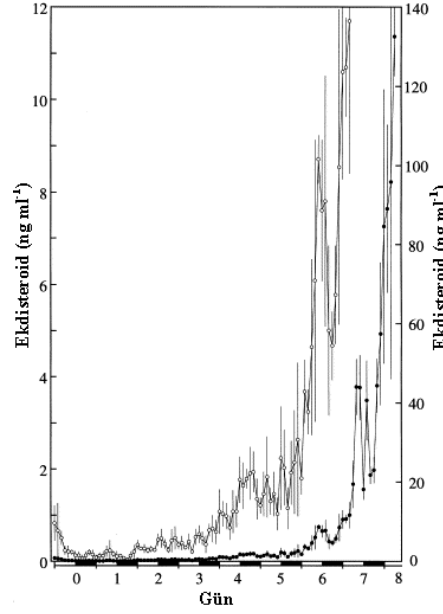
Şekil 3.64 5. larval evrenin 6. günü 10 ng uygulama yapılan gruptan alınan anterior ipek bezlerinin DNA jel elektroforezi. Marker (M), 5.larval evrenin 7. günü (7), 8. günü (8), 9. günü (9), pupalaşma (P0), pupal safhanın 12. saati (P12), pupal safhanın 24. saati(P24). Solda gösterilen sayılar baz çiftlerini göstermektedir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

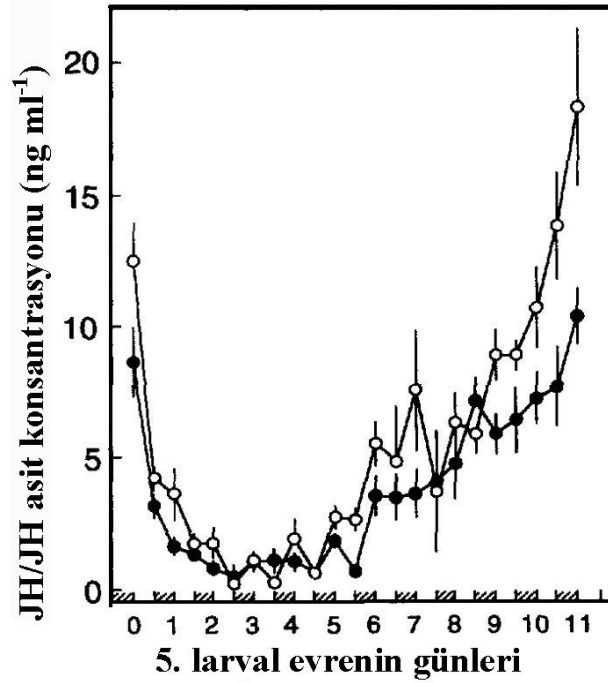
4.1 Juvenil Hormon Analogu Fenoxycarb Uygulamasının 5. Larval Evre Üzerine Etkileri

Juvenil hormonun böcek gelişimini düzenlemede oynadığı rolün anlaşılmasında juvenil hormon aktivitesine sahip sentetik bir böcek büyüme düzenleyicisi sınıfınının yani juvenil hormon analoglarının geliştirilmesi oldukça etkili olmuştur (Dedos. et. all, 2002). Pek çok böcek türünde larval gelişim süresince juvenil hormon analoglarının uygulanması endokrin dengeyi alt üst eder ve sonuç olarak anormal gelişime neden olur (Kamimura. et. all., 1998; Dedos. et. all., 2002, Dedos. et. all, 1999). Yaptığımız çalışmada *Bombyx mori*'de 5. larval evrenin 0., 3., ve 6. günlerinde 1 ve 10 ng olmak üzere iki farklı dozda juvenil hormon analoğu fenoxycarb topikal olarak uygulanmıştır. Uygulama zamanları ve uygulanan konsantrasyonlara 5. larval evrede belirlenen hormonal şartlar ve daha önce bu konuda yapılmış çalışmalar ışığında karar verilmiştir. Dördüncü deri değişiminden sonra hemolenfte juvenil hormon miktarı azalmaya başladığı ve sonuçta 5. larval evrenin. 3. günü belirlenemez düzeye indiği gösterilmiştir. Bu noktada corpora allata'nın salgı aktivitesi durduğu ve 4. günden itibaren yeniden yükselişe geçtiği belirlenmiştir (Şekil 4.2) (Nimi and Sakurai, 1997). Protorasik bez de 5. larval evrenin ilk üç günü salgı aktivitesine sahip değildir. PTH'e tepki yeteneğini kaybetmiştir. Bundan dolayı hemolenfte ekdizon miktarı da ilk üç gün boyunca düşüş gösterir. Ancak 3. günün ikinci yarısından itibaren ekdizon miktarındaki yükseliş başlar. Burada ekdisteroid miktarının yükselişi ile dokular pupal kabullenme sürecine girerler. Ekdizon'un yükselişi devam eder ve 6. günde bir tepe noktasına ulaşır.

Buradaki ekdizon salınımı koza örme davranışının başlamasına ve hücrelerin pupal dönüşüm için mekanizmalarının harekete geçmesine neden olur (Şekil 4.1) (Sakurai et.,all., 1998; Takaki and Sakurai, 2003).



Şekil 4.1 *Bombyx mori*'de 5.larval evre boyunca hemolenf ekdisteroid miktarındaki değişimler; sol ordinat açık daireler, sağ ordinat siyah daireler içindir (Sakurai et., all., 1998).



Şekil 4.2 *Bombyx mori*'de 5. larval evre boyunca juvenil hormon ve juvenil hormon ve juvenil hormon asit miktarları. Siyah daireler juvenil hormon miktarını, açık daireler juvenil hormon asit miktarlarını göstermektedir (Nimi and Sakurai, 1997).

Dördüncü deri değişiminden hemen sonra 0. günde belirlenen hormonal şartlar diğer deri değişimlerinde belirlenenlerden farklıdır ve bu farklılığın larval-pupal dönüşümün gerçekleşebilmesi için gerekli olduğu araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Sakurai et.,all., 1998; Takaki and Sakurai, 2003). Bundan dolayı 0. günde hemolenfte nispeten yüksek miktarda bulunan juvenil hormonun dışardan uygulanan juvenil hormon analogu fenoxycarb'la miktarının artırılması ve bunun evrenin ilerleyen dönemlerinde yaratacağı etkiyi belirlemek için ilk uygulama günü 0. gün olarak seçilmiştir.

3. günde juvenil hormon belirlenemez düzeye iner ve ekdisteroid miktarı yükselmeye başlar. Ekdisteroid miktarında meydana gelen bu küçük artışın özellikle ekdizon hormon reseptörlerinin ekspresyonu için önemli olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Gu et., all., 1997; Mizoguchi 2001; Obara et., all., 2002, Koyama et., al., 2004) . Tüm bu bulgular 5. larval evrenin bu günündeki hormonal şartların pupal dönüşüm ve ipek bezinin anterior kısmında görülen programlanmış hücre ölümünün meydana gelebilmesi için önemli olduğunu göstermektedir. Bu günde normalde olmaması gereken juvenil hormonun dışarıdan yapılan uygulama ile hemolenfte bulunduğu nasıl bir etki yaratacağı 3. günde yapılan fenoxycarb uygulamaları ile açığa çıkarılmıştır.

5. larval evrenin 6. günü hemolenfte ekdisteroid miktarının pik noktasına ulaştığı gündür. Bu günde gözlenen pik noktası ile larval dokularda programlanmış hücre ölümü başlar ve larval-pupal deri değişimi uyarılır. Bu günde uygulanacak juvenil hormon analogu fenoxycarb'ın etkisinin bu fizyolojik olaylar üzerine etkisi belirlenmiştir.

Uygulanan dozlara da uygulama günlerinin belirlenmesinde olduğu gibi daha önce farklı araştırmacılar tarafından yapılmış çalışmalara dayanılarak karar verilmiştir. İpekböceği *Bombyx mori*'nin fenoxycarb'a en hassas olduğu dönemin. 5. larval evre olduğu belirlenmiştir. 5. larval evrede fenoxycarb'ın uygulanan doza bağlı olarak beslenme periyodunu uzattığı bildirilmiştir. 10 ng fenoxycarb'la muamele edilen larvaların %90'nının larval evreyi sürdükları (**daurer larva**); 100 ng ve üstü uygulanan dozlarda ise hiçbir larvanın koza örmediği ve öldüğü belirtilmiştir. (Kamimura, 1995; (Kamimura and Kiuchi, 1998; Monconduit and Mauchamp, 1998). Bundan dolayı 10 ng ve 1 ng olmak üzere iki farklı doz uygulanmıştır.

Elde ettiğimiz bulgular 5. larval evrenin 0. ve 3. günlerinin fenoxycarb'a hassas olduğunu göstermiştir. 0. günde yapılan uygulamalar beslenme periyodunu ve dolayısıyla larval evreyi uzatmış; uygulanan doza bağlı olarak pupalaşmayı önlemiştir. 3. günde yapılan uygulamalar ise larval evrenin uzamasına neden olmuş ve bu hayvanlar koza örme davranışı göstermemişlerdir (Çizelge 1). Yaptığımız çalışmada bu grup hayvanlarda 5. larval evrenin 20 güne kadar uzadığı görülmüştür. Son larval evrenin erken dönemlerinde yapılan juvenil hormon uygulamalarının larval safhanın uzamasını sağladığı ve böylece larval-pupal değişimin başlamasını durdurduğu farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Kamimura et. all., 1998; Dedos et. all, 1999 ; Dedos et all, 2002).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre *Bombyx mori*'de 5. larval evre fenoxycarb'a hassasiyet bakımından 3 safhaya ayrılmıştır. Bu bulgu Kamimura and Kiuchi (1998)'nin yaptıkları çalışmayla aynı yöndedir. Bu çalışmaya göre ilk safha 0-2. günler arasındadır. Bu periyot boyunca uygulanan fenoxycarb doza bağlı olarak larval evreyi uzatır ve pupalaşmayı önler ancak ekstra deri değişimi meydana gelmez. İkinci safha 3.-5. günler arasındadır. Burada uygulanan fenoxycarb ya beslenme periyodunun uzamasına ya da ekstra deri değişimine neden olur. Üçüncü evre ise 6.-7. günlerdir. Fenoxycarb'ın gelişim üzerine etkisi oldukça azdır. Benzer juvenil hormon analoglarının da uygulama zamanı ve doza bağlı olarak benzer etkiler meydana getirdiği bilinmektedir. (Kamimura and Kiuchi, 1998).

Fenoxycarb'ın bu etkileri nasıl meydana getirdiği farklı araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. 4. larval evrede ya da 5. larval evrenin başlarında corpora allata'sı çıkartılan hayvanlar fenoxycarb'la muamele edildiklerinde larval gelişimin normal meydana geldiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlara

göre fenoxycarb potansiyel olarak juvenil hormonu taklit edebilir. Juvenil hormonun yerini alarak ya da juvenil hormonun hemolenfte bulunma durumunu uyararak rol oynayabilir (Monconduit and Mauchamp, 1998).

Manduca sexta'da son larval safhadaki uzamanın juvenil hormon ya da juvenil hormon analogları tarafından protorasikotropik hormon (PTTH) salınımının baskılanması yoluyla meydana geldiği gösterilmiştir (Smith et al. 1993).

Gu et al., (1997), yaptıkları çalışmada *Bombyx mori*'de son larval evrenin ilk 4 günü boyunca hayvanlara her gün juvenil hormon analogu hydroprene (hidropren) uygulamışlardır. Bunun sonucunda larval gelişim büyük ölçüde baskılanmış ve pupalaşma kontrol gurubuna göre 4-5 gün gecikmiştir. Meydana gelen bu farklılığın hemolenfteki ekdisteroid düzeyinin artışının gecikmesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. PTTH'nun ekdisteroid salınımını protorasik bez hücrelerinin yüzey reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Son larval evrenin ortalarına doğru corpora allata'nın juvenil hormon sentezini durdurması ve juvenil hormonun yokluğunun fonksiyonel PTTH reseptörlerinin oluşumunu sağladığı ve PTTH'nun protorasik bezi bu yolla ekdizon sentezlemesi için uyardığı gösterilmiştir (Gu et., al., 1997).

Beyindeki nörosekresyon hücrelerinden salınan PTTH'nun protorasik bezde siklik AMP (cAMP) yolu ile etki gösterdiği bulunmuştur. PTTH'nun 5. larval evre boyunca farklı zamanlarda protorasik bezde cAMP sentezini uyardığı gösterilmiştir. Bezdeki cAMP içeriği 5. larval evrenin 0. gününden 2. gününe kadar artmaya başlar ve en fazla artış 3. günde gözlenir. Dedos ve Fugo (1999), ipekböceğinde yaptıkları çalışmada, 5. larval evrenin 2.

gününde 1µg/5µl fenoxycarb uygulaması ile 5. larval evrenin ilerleyen dönemlerinde protorasik bezde cAMP sinyalinin fonksiyonelliğini kaybettiğini ve bunun sonucunda da ekdisteroid miktarında düşme meydana geldiğini belirlemişlerdir. Ancak fenoxycarb'ın doğrudan cAMP salgı aktivitesine etki etmediği görülmüştür. Fenoxycarb uygulamasından sonraki 5. larval evrenin 54. ve 84. saatlerinde hemolenf PTTH miktarlarını ölçmüşlerdir. Kontrol grubuyla yapılan karşılaştırma da 66. saate kadar PTTH miktarının uygulama yapılan gruplarda oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Fenoxycarb uygulaması ile meydana gelen bu değişimin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bundan dolayı, juvenil hormonun uyardığı son larval evredeki uzamanın sadece PTTH'in baskılanmasından dolayı değil aynı zamanda protorasik bezin salgı aktivitesini etkilemesinden de kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu amaçla 5. larval evrenin 48. saatinde uygulama yapılan gruptan 6 saat aralıklarla protorasik bezleri alınarak; salgı aktivitelerini ham beyin ekstraktları (cPTTH) varlığında belirlemişlerdir. Uygulama yapılan hayvanlardan alınan bezlerin 66. saate kadar olan salgı aktivitesinde artış olduğu ve kontrolden farklı olmadıkları görülmüştür. Ancak 5. larval evrenin 72. saati ve sonrasında uygulama yapılan grupta salgı aktivitesinin düşmeye başladığı ve kontrolden daha düşük ve oldukça farklı olduğunu belirlemişlerdir (Dedos and Fugo, 1999).

Bombyx mori'de fenoxycarb uygulamasının protorasik bezin PTTH tarafından uyarıları alabilme yeteneğini etkilediği ve bu etkinin de özellikle 5. larval evrenin 66 ile 72. saatleri arasında meydana geldiği belirlenmiştir (Dedos and Fugo, 1999). Fenoxycarb uygulaması sonrasında düşük ekdizon miktarının juvenil hormonun uzun süren etkisinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Juvenil hormonun bezin aktivitesi üzerindeki etkisinin PTTH

sinyal iletim yolundaki baskılanmayla gerçekleştiğine ilişkin başka çalışmalar da mevcuttur (Mizoguchi et.,al., 2001). Monconduit and Mauchamp (1998), yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Bütün bu çalışmalar ışığın da çalışmamızda 3. günde yapılan uygulamalar sonucunda hayvanların sürekli larval evrede kalmaları ve larval-pupal dönüşümün gerçekleşmemesinin nedeni olarak fenoxycarb'ın protorasik bezin PTTH uyarısını alma yeteneğini etkileyerek; özellikle de protorasik bez üzerindeki PTTH reseptörleri üzerinde rol oynayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Kamimura and Kiuchi, (1998), yaptıkları çalışmada *Bombyx mori*'de 5. evre larvalarına 0. günde 1 ng fenoxycarb uygulandığında hemolenf ekdisteroid miktarının 12. günden itibaren artmaya başladığını ve pupalaşmadan hemen önceki 16. günde pik noktasına ulaştığını belirlemişlerdir. Yapılmış olan bu çalışmanın ışığında, çalışmamızda aynı uygulama grubundaki hayvanların 12. günden itibaren örme davranışı göstermesinin sebebinin 12. günden itibaren meydana gelen ekdisteroid artışı olduğu düşünülmektedir.

Dedos (2002) yaptığı çalışmada *Bombyx mori*'de 5. larval evrenin 0. gününde 0,2 µg/5µl fenoxycarb'ı topikal olarak bir kez uygulanmıştır. Uygulama sonrası hemolenfte fenoxycarb miktarını ölçülmüştür. Hemolenf hacmiyle vücut ağırlığı arasında kurulan bağlantıyla uygulamadan 1.5 saat sonra uygulanan dozun %39'unun hemolenfte bulunduğu uygulamadan 6 saat sonra bunu %19 oranında düştüğü belirlenmiştir. Feçesle atılan toplam miktar uygulamadan 48 saat sonra %97.8'dir. (Dedos, 2002). Uygulanan fenoxycarb'ın hayvanın vücudu içerisinde kalış süresinin çok uzun olmaması

etki sürecine de yansımaktadır. 0. günde 1 ng uygulamasından elde ettiğimiz sonuçlar, hayvanların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında geç de olsa örme davranışı göstermeleri, uygulanan fenoxycarb'ın vücutta kalış ve etki süresiyle alakalı olabilir.

Kamimura and Kiuchi (2002) yaptıkları çalışmada ipekböceği *Bombyx mori*'nin fenoxycarb'a oldukça hassas olduğunu belirtmişlerdir. Pikogram düzeyinde fenoxycarb'ın 5. larval evrenin 0. gününde topikal olarak ya da diyetle uygulanmasının evrenin süresinin uzamasına ve uygulanan doza bağlı olarak normal pupalaşmanın baskılanmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Beyin-protorasik bezin juvenil hormona hassasiyetinin son larval evrenin ilk 4 günü boyunca farklı olduğu Kakei et., all. (2004), tarafından da gösterilmiştir. 3. günde juvenil hormon uygulamasının beyin-protorasik bez bağlantısını baskıladığı ve hemolenf ekdisteroid miktarının düşük kalmasını sağladığı bildirilmiştir. Bu hormonal şartların pupal kabullenme sürecini de baskıladığı ortaya çıkmıştır (Kakei et., all., 2004).

5. larval evrenin 6. gününde yaptığımız fenoxycarb uygulamalarının bu evre üzerine etkisi yok denecek kadar azdır. Yaptığımız çalışmamızda bu uygulama grubu hayvanlar kontrol grubuyla aynı gelişimi göstermişlerdir. Beslenme periyodunda uzama ya da örme davranışının baskılanmaması 6. günde yapılan uygulamaların herhangi bir etki yaratmadığını göstermektedir. Bu durum hemolenfte 3. günde belirlenen küçük ekdisteroid artışının larval-pupal dönüşüm için önemli olduğunu doğrulamaktadır. Ancak bu grup hayvanlarda normal larval-pupal deri değişiminin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha az meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 1). Bu

etkinin fenoxycarb uygulamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar Kamimura and Kiuchi (1998), ile paralellik göstermektedir.

4.2 Total Vücut Ağırlıkları

5. larval evrede total vücut ağırlığı hayvanların gelişimlerinin belirlenmesinde önemli bir parametredir (Leonardi et., all., 1996; Kamimura and Kiuchi, 1998). Bundan dolayı fenoxycarb uygulamasının vücut ağırlığı üzerindeki etkisini görebilmek için 5. larval evrenin ilk gününden pupal safhaya geçebilen gruplarda pupal safhaya kadar, pupal deri değişimi göstermeyen gruplarda 14. güne kadar total vücut ağırlığı ölçümü yapılmıştır.

Kontrol grubunda total vücut ağırlığının örmenin başladığı 7. günden pupalaşmanın gerçekleştiği 10. güne kadar azalma gösterdiği belirlenmiştir. Beslenme periyodunun sona ermesi, örme aktivitesiyle vücut içerisindeki ipek proteinlerinde azalmanın olması ve ipek bezinde total olarak meydana gelen dejenerasyon bu ağırlık azalışının nedenidir (Şekil 3.1).

0. günde 1 ng uygulama yapılan grupta ağırlık artışı 7. günden 12. güne kadar devam etmiştir. Bu hayvanlar 12. günden itibaren örme davranışı göstermişler ve bu günden itibaren 14. güne kadar total vücut ağırlığında azalma meydana gelmiştir. 7-12. günler arasındaki ağırlık artışının uygulanan fenoxycarb nedeniyle örme aktivitesinin başlamaması ve hayvanın yeme periyoduna devam etmesinden kaynaklandığı görülmektedir. 12. günde meydana gelen örme aktivitesiyle kontrol grubunda belirlenen ağırlıktaki azalış bu uygulama grubunda da görülmüştür (Şekil 3.1). Ancak pupal safhaya geçmeden hemen önce kaydedilen değer kontrol grubunda

belirlenenden yüksektir. Kamimura and Kiuchi (1998) yaptıkları çalışmada 1 ve 100 ng uygulamalarında ağırlık artışının 7. günden itibaren devam ettiğini ve kontrolde ölçülen maksimum değer 1.5 misline ulaştığını bildirmişlerdir.

0. günde 1 ng fenoxycarb uyguladığımız deneme grubundaki hayvanların ördükleri kozaların kontrol grubunda elde edilen kozalardan daha büyük olması da ipek bezinin kontrol grubundan daha fazla geliştiğinin bir göstergesi olabilir.

0. günde 10 ng fenoxycarb uygulanan grupta total vücut ağırlığı 7. günden 14. güne kadar sürekli artış göstermiştir. Ağırlıkta görülen bu artış 11. güne kadar nispeten daha yüksek miktarda olurken 11. günden 14. güne kadar bu artış hızında gerileme olmuştur. Ağırlık artışındaki süreklilik uygulanan fenoxycarb'ın larval karakterleri devam ettirmesinden dolayı beslenme periyodunun sürmesi ve bu hayvanların hiçbir zaman örme davranışı göstermemesinden kaynaklanmaktadır. Ancak artışta 11. günde görülen yavaşlama hayvanların bu günden itibaren yeme aktivitelerinde görülen azalmayla bağlantılıdır. Hayvanın boyutlarında meydana gelen aşırı büyümenin yeme aktivitesini baskıladığı düşünülmektedir (Şekil 3.1).

3. günde 1 ng ve 10 ng uygulanan deney grubunda total vücut ağırlığı açısından önemli bir farklılık yoktur. Hayvanlar 14. güne kadar beslenme periyodunda kalmışlardır. Ancak 0. günde 10 ng uygulanan gruba benzer olarak ağırlıkta meydana gelen artış ilerleyen günlerde yavaşlamıştır. Bu grup hayvanlarda da ağırlık artışındaki gerileme beslenme aktivitesindeki düşüşle bağlantılıdır (Şekil 3.2).

6. günde 1 ng ve 10 ng uygulanan gruplar kontrol grubuyla benzer durum göstermektedir. Bu günde uygulanan fenoxycarb'ın total vücut ağırlığına herhangi bir etkisi olmamıştır (Şekil 3.3).

4.3. İpek Bezinin Anterior Kısımında Görülen Morfolojik Bulgulara Ait Sonuçlar

Holometabol böceklerde, pupal metamorfoz boyunca dokular ve hücreler aktif deri değişimi hormonu 20-hidroksiekdizon (20E)'a karakteristik tepkiler gösterirler. Hücreler son larval evrede metamorfoza neden olan 20E pikinden önce kaderlerine karar verirler. Hücrelerin kaderleri 4 şekilde sınıflandırılabilir. (1) İmajinal disk gibi dokular pupal daha sonra da ergindeki formlarına farklılaşırlar. (2) Pek çok holometabol böcekte epidermis gibi dokularda pupal kütikülü oluşturmak için bir gen seti değişir. Larval doku hücreleri metamorfozdan sonra da varlıklarını sürdürürler. (3) Orta barsak gibi dokular da larval hücrelerinin yerini larval safhalar boyunca primordial hücreler olarak var olan yeni farklılaşmış hücrelerin almasıyla yeniden şekillenir. (4) Larvaya spesifik dokular metamorfozdan hemen sonra programlanmış hücre ölümü yoluyla dejenere olurlar. Tükrük bezleri, motornöronlar, segmentler arası kaslar, protorasik bezler ve ipek bezleri bu sınıfa girer (Kakei et., all., 2004).

Programlanmış hücre ölümüyle ilgili yapılan pek çok çalışmada hücrelerin komşu hücrelerle ve ekstrasellüler matriksle bağlantısının azaldığı, organel bütünlüğünü korumak için sitoplazmanın yoğunlaştığı, hücrenin dış taslağının düzensizleştiği ve nukleus yıkımının meydana geldiği bildirilmiştir (Majno and Joris, 1995; Kiess and Gallaher, 1998; Saraste and Pulkki, 2000).

Tüm bu morfolojik bulgular ipek bezinin anterior kısmında yaptığımız incelemelerde de görülmektedir.

Kontrol grubu ipek bezlerinin faz-kontrast mikroskobu incelemelerinde 7. ve 8. gün bezlerinin programlanmış hücre ölümüne ait herhangi bir morfolojik bulguya rastlanmamıştır (Şekil 3.5a, 3.6a). Ancak 9. günden itibaren hücrelerarasında meydana gelen ayrılmalar; pupalaşma sonrasında hücre küçülmesi, hücre içeriğinin yoğunlaşması ve otofajik vakuollerin ortaya çıkışı programlanmış hücre ölümünün tipik göstergeleridir (Şekil 3.7a, 3.8a, 3.9a, 3.10a, 3.11a, 3.12). Matruura et., all., (1968), ipek bezinin posterior kısmında yaptıkları çalışmada larva-pupa dönüşümü sırasında hücrelerde otofagosomların ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Hücre içinde bulunan organellerin oluşan otofagosomlarla çevrelendiklerini elektron mikroskobu çalışmalarıyla göstermişlerdir.

Elde ettiğimiz sonuçlar Terashima, et., al., (2000) ve Kakei et., all., (2004) tarafından yapılmış çalışmalarla da uyumludur. *Drosophila melanogaster* larval tükrük bezinde metamorfoz sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölümünün de benzer morfolojiye sahip olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Jiang et., all., 1997; Lee et., all., 2002; Baehrecke, 2003). *Galleria mellonella* ipek bezinde görülen programlanmış hücre ölümü *Bombyx mori*'de ipek bezinin anterior kısmında belirlenenle benzerlik göstermektedir (Sehnal and Michalik, 1984).

Böceklerde metamorfoz sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölümünün otofajik tipte programlanmış hücre ölümü olduğuna ilişkin pek çok yayın bulunmaktadır. Bu tip hücre ölümünde oluşan otofajik vakuollerin lizozomlarla birleşerek hücre içi yapıyı sindirdiği belirlenmiştir.

Bundan dolayı da diğeri bir programlanmış hücre ölüm tipi olan apoptozisde görülen fagositozla ölen hücreyi ortadan kaldırma işlemi bu tip hücre ölümünde görülmez (Baehrecke, 2003; Guimaraes and Linden, 2004; W. Bursch, 2004). Yaptığımız faz-kontrast mikroskobu incelemelerinde programlanmış hücre ölümüne ilişkin morfolojik özelliklerin tümü kontrol grubunda ve 6. günde uygulama yapılan gruplarda 5. larval evrenin 9. gününden itibaren görülmektedir. Otofajik vakuollerin ise özellikle pupalaşma ve sonrasında ortaya çıktığı belirlenmiştir.

0. günde 1 ng fenoxycarb uygulaması yapılan grupta 12. günden itibaren faz kontrast mikroskobu incelemesinde hücreler arası sınırların belirgin hale geldiği ve hücre içeriğinin yoğunlaşmaya başladığı görülmektedir (Şekil 3.17, 3.18, 3.19). Programlanmış hücre ölümüne ilişkin bulgular gözlenmeye başlanması bu gündeki hormonal şartların kontrol grubunda 8. günde ortaya çıkan hormonal şartlarla aynı olduğunun bir göstergesi olabilir.

0.günde 10 ng uygulama yapılan grupta morfolojik olarak programlanmış hücre ölümüne ilişkin belirti olmamasının 1 ng uygulama yapılan grupta karşılaştırıldığında uygulanan dozun daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kamimura and Kiuchi, 1998'de yaptıkları çalışmada da benzer sonuç elde etmişlerdir. 10 ng uygulaması sonrasında kontrol grubunda oluşan hormonal şartların yerine gelmediği düşünülmektedir.

3. günde 1ng ve 10 ng fenoxycarb uygulanan gruplarda 5. larval evrenin 14. gününe kadar programlanmış hücre ölümüne ilişkin bir bulgu yoktur. Hücreler düzgün bir hat üzerine dizilmişlerdir. Hücre içeriğinde

yoğunlaşma belirlenmemiştir (Şekil 3.28-3.43). Kamimura and Kiuchi (1998), Kakei et., all., 2004 yaptıkları çalışmalarda 5. larval evrenin 3 ve 4. günlerinin fenoxycarb'a en hassas günler olduğunu belirlemişlerdir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da bu bilgileri desteklemektedir. 3. günde yapılan uygulamalar sonucunda ortaya çıkan larva-pupa dönüşümündeki baskılanmanın küçük ekdizon salınımının fenoxycarb uygulamasıyla engellenmesi ya da dokuların bu salınımına cevap yeteneklerini değiştirerek etkili olduğu düşünülmektedir.

6. günde yapılan uygulamalar sonrasında kontrol grubuyla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu dönemde uygulanan fenoxycarb'ın larva-pupa dönüşümü üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır. Kamimura and Kiuchi, 1998'de yaptıkları çalışmada da aynı sonucu tespit etmişlerdir.

4.4. Histolojik Bulgulara Ait Sonuçlar

Lepidoptera'da dokuların çoğu, ergindeki yeni rolleri için metamorfozda yeniden şekillenirler. Bu işlemler ekdisteroidler tarafından JH yokluğunda gerçekleşir (Elmogy et., al., 2004). Yaptığımız histolojik çalışmada *Bombyx mori*'de ipek bezinin anterior kısmında larval-pupal metamorfoz sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölümünün özellikleri histolojik olarak belirlenmiş ve juvenil hormon analogu uygulamasının buna etkisi gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarla bu dönem boyunca, daha önce farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiş, hormonal şartlar göz önüne alınarak juvenil hormonun etkisine açıklık getirilmeye çalışılmıştır.

Lepidoptera larvalarındaki ipek bezleri labial tükürük bezinden orijinlenirler. İpek bezlerinin gelişimsel aktivitesi hormonlarla kontrol edilir. Düşük ekdisteroid düzeyleri deri değişimi aralarındaki periyotlar boyunca bezin aktivitesini destekler. Yüksek ekdisteroid ise larval deri değişimleri boyunca örme davranışında gerilemeye neden olur. Pupal deri değişimi boyunca bezin histolizisinin tamamlanması yüksek ekdisteroid miktarı ile mümkün olur ve bu işlem juvenil hormon uygulaması ile önlenabilir (Kodrik and Sehnal, 1994).

Yapılan çalışmalarda 20-hidroksiekdizonun (20E)'un pupal metamorfoz sırasında, larval dokularda programlanmış hücre ölümünü uyaran temel faktör olduğu gösterilmiştir. İpek bezi de larvaya spesifik bir dokudur ve pupalaşmadan hemen sonra dejenere olur. Pupal metamorfozu uyaran yüksek hemolenf ekdisteroid konsantrasyonuna tepki olarak hücreler programlanmış hücre ölümü işlemlerini başlatırlar (Terashima et., al., 2000; Kakei et., all., 2004).

Juvenil hormonla ilgili yapılan çalışmalarda ise onun, programlanmış hücre ölümünü geciktirdiği ya da baskıladığı bulunmuştur (Dai and Gilbert, 1998; Capella and Hartfelder, 1998; Kakei et., all., 2005).

İpekböceği *Bombyx mori*'de anterior ipek bezi uniform tek tabaka halinde dizilmiş beşgen hücrelerden oluşan ince tüpsü bir kanaldır (Şekil 3.4). Akai, (1998) tarafından yaklaşık 300 hücreden oluştuğu belirlenmiştir. Yaklaşık 0.5mm çapa sahiptir. Hücrelerin apikal yüzeyi kütikula intima ile sınırlanmıştır. Bezin lümeni ise sıvı halde bulunan ipek ile doludur. Perdrix and Gillot, (1979), anterior ipek bezini oluşturan hücrelerin nukleuslarının 13 endomitotik siklus sonucunda büyüdüğünü ve dallandığını belirlemişlerdir.

İpek bezi larval deri değişimi ve pupal dđnüşüm sırasında farklı morfolojik değişimler gösterir. Larval deri değişimlerinde, bezin iç yüzeyini kaplayan kalın kütiküler tabaka dejenere olur ve deri değişiminden önce yeni kütikül sentezlenir. Kütikülün öncül yapıları olan fibröz materyallerin yoğun kümeleri kütikülün iç yüzeyi ile apikal sitoplazma arasındaki alanda görülür. Buna zıt olarak bezi oluşturan hem kütiküler tabaka hem de hücreler, pupalaşmada, programlanmış hücre ölümü yoluyla dejenere olur. Bu morfolojik değişimler ekdizon ve juvenil hormon uygulamalarıyla yeniden düzenlenebilir. Bundan dolayı anterior ipek bezi larval deri değişimi ve metamorfozda hormonal etkilerin analiz edilmesi için iyi bir model oluşturur (Takayashi M., et. all., 2002).

Bombyx mori'de ipek bezinin anterior kısmının bu histolojik özellikleri; larval deri değişimi ve pupal dđnüşüm sırasında farklı morfolojik değişimler geçirdiği araştırıcılar tarafından da gösterilmiştir (Azuma and Ohta, 1998; Akai, 1998; Takayashi M., et. all., 2002).

Juvenil hormonla ilgili yapılan çalışmalarda programlanmış hücre ölümünü geciktirdiği ya da baskıladığı bulunmuştur. *Manduca sexta*'da yapılan bir çalışmada larva-pupa deri değişiminden sonra görülen protorasik bezin programlanmış hücre ölümüyle meydana gelen dejenerasyonunun juvenil hormon tarafından önlenebileceği gösterilmiştir (Dai and Gilbert, 1998).

Bombyx mori'de, ipek bezinin anterior kısmının 5. larval evrenin 7. gününden 14. gününe kadar hazırladığımız histolojik kesitleri de fenoxycarb'ın uygulama zamanı ve uygulanan doza bağlı olarak programlanmış hücre ölümünü engellediğini göstermektedir.

4.4.1 Kontrol Grubu

İpekböceği, *Bombyx mori*'de 5. larval evrede 7. günün ikinci yarısından itibaren meydana gelen 20E salınımları belirlenmiş ve pupa öncesi dönemde ölçülen en yüksek miktarın 9. günün sonlarında 1500 ng/ml olduğu gösterilmiştir (Terashima, et., al., 2000).

9. günde hemolenfte görülen yüksek ekdisteroid pikinin programlanmış hücre ölümünün tamamlanması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Larva - pupa dönüşümü uyarmak için gerekli olan ve 3. günde salınımı gerçekleşen ekdisteroid miktarı programlanmış hücre ölümünü tetiklemede etkili değildir. Bu dokuların dejenerasyonu için gerekli olan ekdisteroid sinyalinin doku farklılaşması için gerekli olandan çok daha güçlü olması gerektiği gösterilmiştir (Terashima, et., al., 2000).

Bu hormonal şartlar altında bezde meydana gelen histolojik değişimler programlanmış hücre ölümüyle hormon ilişkilerinin anlaşılması açısından önemlidir.

Kontrol grubu ipekböceklerinden alınan ipek bezlerinin anterior kısımlarının histolojik incelemelerinde 7. ve 8. günlerde bezi oluşturan hücrelerin düzgün bir hat üzerine dizildikleri ve programlanmış hücre ölümüne ait herhangi bir yapısal özelliğe sahip olmadıkları görülmüştür (Şekil 3.5b, 3.6b). 9. günden itibaren hücreler arasındaki bağlantının zayıflaması açıkça ayırt edilmektedir (Şekil 3.7b). Pupaşmanın gerçekleştiği 10. günde sitoplazma içerisinde vakuol oluşumunun başladığı görülmüştür (Şekil 3.8b). Otofajik programlanmış hücre ölümü ile ilgili yapılan çalışmalarda bu otofajik vakuoller farklı hayvanlarda ve farklı

dokularda belirlenmiştir. Martin and Baehrecke (2003) *Drosophila*'da larval larval-pupal metamorfoz sırasında tükrük bezinde yaptıkları çalışmada pupal deri değişiminden 14 saat sonra sitoplazmada otofajik vakuolleri belirlemişlerdir. *Manduca sexta*'da labial bezde larval-pupal dönüşüm sırasında otofajik hücre ölümü görüldüğü belirlenmiş ve elektron mikroskobu çalışmalarıyla oluşan otofajik vakuoller gösterilmiştir (Lockshin and Zakeri, 2004). Pupa-ergin metamorfozu boyunca protorasik bez de programlanmış hücre yoluyla dejenere olur. Dai and Gilbert (1999), *Manduca sexta* protorasik bezinde yaptıkları çalışmada otofajik vakuollerin oluşumunu göstermişlerdir. Yine *Manduca sexta* yağ dokusunda yapılan bir çalışmada larval yağ dokusunun son larval evrede programlanmış hücre ölümü yoluyla dejenerasyonu ve oluşan otofajik vakuoller belirlenmiştir (Müler et., al., 2004).

Pupal deri değişiminin gerçekleştiği andan itibaren vakuollerin hızlı bir şekilde oluştukları ve histolojik değişimlerin hızlı bir şekilde meydana geldiği yaptığımız histolojik incelemelerde belirlenmiştir. Pupal deri değişiminden önce görülen yüksek ekdisteroid salınımının bu değişimlerin hızlanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Pupal safhanın 12. saatinde vakuol oluşumunun yanında sitoplazmadaki yoğunlaşma da dikkat çekmektedir (Şekil 3.9b). Nukleusun parçalara ayrılması programlanmış hücre ölümü için tipiktir. Ancak ipek bezinin anterior kısmında hücrelerin polyploid genoma sahip olmaları nedeniyle oldukça büyük, dallanmış bir nukleus içermeleri alınan kesitlerde hücrede birden fazla nukleus bulunduğu izlenimi yaratmaktadır. Bundan dolayı nukleusun parçalanması ile ilgili olarak sağlıklı bir karar verilmesi bu kesitlere bakarak mümkün görülmemektedir. Ancak nukleuslarda genişleme olduğu belirlenmiştir. Pupal safhanın 24. saatinde vakuollerin daha da artması ve genişlemesi, nukleusun

küçülerek hücrenin bazaline çekilmesi, hücrede meydana gelen dejenerasyonun özellikle apikal bölgede daha hızlı meydana geldiğini göstermektedir (Şekil 3.10b). 36. saatte bezde dejenerasyon daha da ilerlemiş, bez bütünlüğünü kaybetmiş ve kütikula intimanın tamamen dejenere olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.11b). Tüm bu bulgular programlanmış hücre ölümünün sonlandığını göstermektedir.

4.4.2 (0. günde 1 ng) Fenoxycarb Uygulaması

Bu uygulama grubunda bezi oluşturan hücrelerin 5. larval evrenin 7. gününden 10. gününe kadar herhangi bir değişim göstermedikleri belirlenmiştir (Şekil 3.12b - 3.15b) Kontrol grubunda 9. günde meydana gelen hücreler arasındaki ayrılma bu uygulama grubunda 11. günden itibaren daha belirgin hale gelmiştir (Şekil 3.16b). Kamimura and Kiuchi (1998), yaptıkları çalışmada 0. günde 1 ng fenoxycarb uygulanan hayvanlarda kontrol grubunda görülen ekdisteroid salınımlarının daha geç meydana geldiğini belirtmişlerdir. Kontrol grubunda 7. günde başlayan ekdisteroid miktarındaki artış fenoxycarb uygulanan grupta 10. günde belirlenmiştir. Bezi oluşturan hücrelerde 11. güne kadar gözlenen yapının aynı kalmasının ekdisteroid salınımlarının gecikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Monconduit and Mauchamp, (1998) yaptıkları çalışmada 0. günde 1 ng uygulama yaptıkları grupta ilk 4 gün boyunca ipek bezinin gelişiminin baskılandığını ancak sonradan gelişimine devam ettiğini bildirmişlerdir. Bu 4 günlük baskılanmanın programlanmış hücre ölümünün gecikmesinde de etkisi olduğu düşünülebilir. Monconduit and Mauchamp (1998) ipek bezi gelişiminin baskılanmasının juvenil hormonun en iyi bilinen etkilerinden biri olduğunu bildirmişlerdir. Bu etkinin genelde 5. larval evrenin ilk günlerinde

topikal olarak juvenil hormon uygulaması sonucu geçici bir baskılanmayla sonuçlandığını ve bu baskılanmayı takiben kontrolden daha hızlı bir gelişimin uygulama yapılan gruptaki hayvanların ipek bezlerinde görüldüğünü göstermişlerdir.

Yapılan benzer çalışmalarda da ipek bezinin gelişiminin fenoxycarb tarafından önce baskılandığı ancak uygulanan doza bağlı olarak sonradan gelişimin devam ettiği bildirilmiştir (Kamimura and Kiuchi, 1998).

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz histolojik bulgulara göre bu grup hayvanlarda 12. günden itibaren bezi oluşturan hücrelerin nukleuslarında küçülme meydana gelmiştir (Şekil 3.17b). Yine bu hücrelerde vakuol oluşumu özellikle 13. günden itibaren görülmeye başlamıştır (Şekil 3.18b). Hayvanlar 13. günde örme safhasının 2. günündedir. Kontrol grubunda özellikle pupalaşmadan sonra gözlenen vakuol oluşumunun bu uygulama grubu hayvanlarında 2 gün önce meydana gelmesi programlanmış hücre ölümünün daha hızlı ilerlediğini göstermektedir. Bunun nedeninin geciken ekdisteroid salınımına bağlı olarak hormon reseptörlerinin ortaya çıkışıyla alakalı olabileceği düşünülmektedir.

4.4.3. (0. Günde 10 ng) Fenoxycarb Uygulaması

5. larval evrenin 0. gününde 10 ng fenoxycarb uygulaması sonrasında 7. günden 14. güne kadar alınan kesitlerde ipek bezinin anterior kısmını oluşturan hücrelerde herhangi bir değişikliğin meydana gelmediği görülmüştür. Göze çarpan tek farklılık 14. günde hücrelerin apikal kısımlarından birbirlerinden ayrılmaya başlamasıdır (Şekil 3.27b).

Bu uygulama grubundan alınan ipek bezlerinin anterior kısımlarında programlanmış hücre ölümünün meydana gelmemesi bu hayvanların larval karakterlerini sürdürdüklerinin de bir göstergesidir. Benzer çalışmalarda *Galleria mellonella* ipek bezinde larval-pupal metamorfoz sırasında programlanmış hücre ölümü yoluyla meydana gelen dejenerasyonun juvenil hormon ile önlenildiği belirlenmiştir (Grzelak and Szczesna, 1982). Kodrik and Sehna (1994), 20E ile kültüve edilen ipek bezlerinde programlanmış hücre ölümünün juvenil hormon tarafından engellendiğini doğrulamışlardır.

Metamorfoz sırasında *Manduca sexta* epidermisinde diğer holometabol böceklerde olduğu gibi pupal kütikülü üretmek için yeniden programlanma meydana gelir. Bu yeniden programlanma “pupal dönüşüme kabul” olarak belirlenir ve genel olarak son larval evrede, beslenme periyodunun 3. gününde, juvenil hormon yokluğunda küçük ekdisteroid salınımı gerçekleştiğinde, 24 saatlik bir dönemde meydana gelir. Kültür ortamında yapılan çalışmalar 20E ile uyarılan bu dönüşümün juvenil hormon varlığında önlenilebileceğini ve epidermin larval kütikül oluşturma durumunun devam ettiğini göstermiştir. Juvenil hormon varlığında yüksek 20E konsantrasyonu uygulansa bile larval kütikül sentezleme yeteneğinin kaybolduğu gösterilmiştir. (Riddiford et., al., 1999).

Yaptığımız çalışmada bu uygulama grubunda programlanmış hücre ölümüne ilişkin herhangi bir bulgunun olmayışının nedeni olarak uygulanan juvenil hormon analogu fenoxycarb'ın dozunun bir önceki uygulama grubuna nazaran yüksek olması ve bunun sonucunda ekdizon salınımının engellenerek ya da hedef dokuların ekdizona tepki yeteneklerinin baskılanarak bu etkilerin meydana geldiği düşünülmektedir. Ekdizon salınımlarının engellenmesinin mekanizmalarına ilişkin çalışmalar mevcuttur.

Gu et., all., 1997 yaptıkları çalışmada ipekböceği *Bombyx mori*'de 5. larval evrenin erken dönemlerinde PTTH sinyal iletiminin düzenlenmesinde juvenil hormonun oldukça önemli olduğunu ve bu düzenlenmenin protorasik bezi oluşturan hücrelerin yüzeyinde yer alan PTTH reseptörlerinin düzenlenmesiyle gerçekleşebileceğini belirtmişlerdir. 0. günde yapılan fenoxycarb uygulaması reseptörlerdeki bu düzenlenmenin baskılanmasına neden olarak ekdizon salınımını engelleyebilir. Ekdizon salınımının meydana gelmemesi programlanmış hücre ölümünü önler.

Kamimura and Kiuchi (1998) ve Dedos (2002) yaptıkları çalışmalarda fenoxycarb'ın etkisini ekdisteroid salınımını baskılayarak ve böylece metamorfik değişimlerin başlaması için gereken eşik değerin altında tutarak gerçekleştirdiği sonucunu çıkarmışlardır. Bu baskılanmanın 3 şekilde gerçekleşebileceğini belirtmişlerdir: PTTH salınımının baskılanması yoluyla, protorasik bezin PTTH'e yanıt yeteneğinin baskılanması yoluyla veya protorasik bezin salgı aktivitesinin baskılanmasıyla.

Fenoxycarb'ın mekanizmasının hemolenfteki juvenil hormon miktarı üzerine etkili olarak değil uygulamadan 24 saat sonra juvenil hormon esteraz benzeri aktiviteyi uyardığından dolayı olduğu düşünülmektedir (Dedos, 2002).

Dedos and Fugo (1996), yaptıkları çalışmada 5. larval evrenin ilk 60 saati boyunca fenoxycarb uygulamasının protorasik bezin salgı aktivitesini baskıladığını bildirmişlerdir.

4.4.4 (3. Günde 1 ng ve 10 ng) Fenoxycarb Uygulanması

3. günde yapılan fenoxycarb uygulamaları her iki dozda da programlanmış hücre ölümünün meydana gelmesine engel olmuştur. Bu uygulama gruplarına ait hayvanların ipek bezlerinin anterior kısımlarını oluşturan hücrelerde 7 - 14. günler arasında herhangi bir farklılık yoktur. Hücreler düzgün bir hat üzerine dizilmiştir. Kütikula tabakası görülmektedir. Hücrelerde ayrılma ya da yoğunlaşma belirlenmemiştir. Bu bulgudan yola çıkılarak 5. larval evrenin 3. gününün uygulama yapılan günler içerisinde fenoxycarb'a en hassas gün olduğu ortaya çıkmaktadır. Kamimura and Kiuchi, (1998), 3-5. günler arasında uygulanan fenoxycarb'ın beslenme periyodunun uzamasına ya da ekstra deri değişimine neden olduğunu bildirmişlerdir. Programlanmış hücre ölümünün bu hayvanların ipek bezlerinin anterior kısmında görülmemesinin nedeninin önceki uygulamada olduğu gibi ekdisteroid salınımindaki baskılanmadan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu uygulama günündeki hormonal şartlara bakıldığında 3. günün ikinci yarısından itibaren ekdizon miktarında yükselişin başladığı gösterilmiştir (Şekil 4.1). Burada yükselen ekdisteroid miktarının dokularda pupal kabullenme sürecini başlattığı bildirilmektedir (Sakurai et.,all., 1998; Takaki and Sakurai, 2003). Juvenil hormon ise 5. larval evrenin. 3. günü hemolenfte belirlenemez düzeye iner. Corpora allata'nın salgı aktivitesi durur. 4. günden itibaren yeniden yükselişe geçer (Şekil 4.2) (Nimi and Sakurai, 1997). Bu bilgiler ışığında 3. günde yapılan juvenil hormon uygulamalarının pupal kabullenme için önemli olan ekdisteroid yükselişini önlediği düşünülmektedir. Bunun sonucunda da bu hayvanlar larval

karakterlerini korurlar ve ipek bezinin anterior kısmında programlanmış hücre ölümü meydana gelmez.

Dedos and Fugo, (1999), yaptıkları çalışmada *Bombyx mori*'de fenoxycarb uygulamasının protorasik bezin PTH tarafından uyarıları alabilme yeteneğini etkilediğini ve bu etkinin de özellikle 5. larval evrenin 66 ile 72. saatleri arasında meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Kakei et., all., (2004), yaptıkları çalışmada gelişimsel programın değişiminin farklı dokularda farklı zamanlarda görüldüğünü belirtmişlerdir. Yaptıkları uygulamada 3. günde beyin-protorasik bezin juvenil hormona hassasiyetinin 4. günden farklı olduğunu ve 3. günde juvenil hormon uygulamasının beyin protorasik bez bağlantısını baskılayarak hemolenf ekdisteroid miktarının düşük kalmasını sağladığını göstermişlerdir. Böylece pupal kabullenme baskılanır. Juvenil hormonun doğrudan ipek bezinin anterior kısmının ekdisteroidlere yanıt yeteneğini baskılayabileceğini de belirtmişlerdir.

4.4.5 (6. Günde 1 ng ve 10 ng) Fenoxycarb Uygulamaları

Bu uygulama grubundan elde edilen histolojik bulgular kontrol grubuyla son derece benzerlik göstermektedir. Buradan çıkan sonuç 6. günün fenoxycarb'a hassasiyetinin olmadığını göstermektedir. Kamimura and Kiuchi (1998), yaptıkları çalışmada 5. larval evrenin 6. ve 7. günde yapılan fenoxycarb uygulamalarının etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. İpek bezinin anterior kısmına ait kesitlerde kontrol grubunda olduğu gibi özellikle 9. günden itibaren programlanmış hücre ölümüne ait yapısal özellikler

belirlenebilmektedir. Kesitlerden programlanmış hücre ölümünün ilerleyişi takip edildiğinde kontrol grubundan farklılığı olmadığı görülmektedir.

Tüm gruplara ait histolojik incelemelerden çıkan sonuç 0. günde yapılan fenoxycarb uygulamalarının etkilerinin doza bağlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir. 5. larval evrenin 3. günü fenoxycarb'a en hassas dönemdir. Bu durumun 3. gündeki hormonal şartlarla son derece sıkı bağlantısı olduğu düşünülmektedir. 6. günde yapılan uygulamaların herhangi bir etkisinin olmaması 3. gündeki ekdisteroid salınımının pupal kabullenme ve ipek bezinin anterior kısmında programlanmış hücre ölümünün meydana gelmesi için önemli olduğunu göstermektedir.

4.5 İmmunohistokimya Sonuçları

Steroid hormonlar, reseptörlerine bağlanarak, yüksek organizmalarda, çok geniş bir aralıkta gerçekleşen gelişimsel ve fizyolojik olayları, safhaya ve dokuya spesifik hedef genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek koordine eder. Çok sayıdaki steroid hormonun reseptörlerinin hücre içinde farklı fonksiyonlara sahip olabilen birden fazla izoformu olduğu görülmüştür (Kamimura et al., 1997).

Böceklerde ekdisteroidler özellikle de 20-hidroksiekdizon (20E) anahtar steroid hormondur. Tüm steroid hormonlarda olduğu gibi ekdizonun reseptörü de nukleer reseptör süper ailesinin üyesidir ve liganda bağlı transkripsiyon faktörü olarak rol oynar.

Drosophila melanogaster'de yapılan çalışmalarda ekdizonun reseptörünün 3 farklı izoformu olduğu belirlenmiştir. Bunlar ekdizon reseptör A (EcR A), ekdizon reseptör B1 (EcR B1) ve ekdizon reseptör B2 (EcR

B2)'dir. EcR B1 izoformu primer olarak programlanmış hücre ölümü yoluna girecek hücrelerde, EcR A'nın ise ekdizona karşı farklılaşma tepkisi veren dokularda görüldüğü belirlenmiştir. (Kamimura et al., 1997; Cakouros et., al., 2004).

Ekdizon reseptörünün omurgalılarıdaki retinoid X reseptörünün homoloğu olan ultraspiracle (ultraspirakıl; USP) ile heterodimer oluşturması gerekmektedir. Retinoid X reseptörlerinin (RXR) fonksiyonu yüksek organizmalarda hormon tepkisinin düzenlenmesinde son derece önemlidir. Ekdizon reseptörlerinde olduğu gibi tiroid hormonu ve retinoid asiti de içeren hormonların, reseptörleri düzenleyici fonksiyonlarını gösterebilmek için RXR ile heterodimer oluşturmak zorundadır (Hall and Thummel, 1998; Riddiford et., al., 2001). Hem ekdizon reseptörü hem de USP N-terminal A/B bölgeleriyle farklılaşan izoformlara sahiptir. (Riddiford et., al., 2001).

Manduca'da USP'nin de iki farklı izoformu vardır. USP1 deri değişimi arasındaki periyotlarda, USP 2 ise deri değişimlerinde bol bulunur. Epidermiste deri değişiminde USP 2 artışı doğrudan 20E'deki yükselişe bağlıdır. Juvenil hormonun varlığı ya da yokluğu bu artışı etkilemez. Buna zıt olarak deri değişimlerinde USP 1'deki azalış yüksek 20 E konsantrasyonunda ve juvenil hormon varlığında meydana gelir (Riddiford et., al., 1999)

Ekdizon reseptör ve USP düzeylerinde yapılan araştırmalar spesifik genlerin aktivasyonu ya da inaktivasyonunda EcR / USP heterodimerinin kritik olduğunu göstermiştir. EcR B1/ USP 1 heterodimerinin bazı genlerin transkripsiyonunun başlattığı ancak EcR B1/ USP 2 heterodimerinin ise böyle bir fonksiyonu olmadığı belirlenmiştir. Hücrede USP 1 ile birlikte yüksek miktarda USP 2 proteinini bulunması bu genlerin aktivasyonunu

engellemektedir. Bu engellemenin EcR B1'e bağlanmak için iki USP izoformu arasındaki yarıştan kaynaklandığı düşünülmektedir. USP 2'nin EcR A ile heterodimer oluşturduğu düşünülmektedir (Riddiford et., al., 1999).

Transkripsiyonu ekdisteroidlerle düzenlenen bazı genlerin promotore bölgelerine yalnızca EcR B1/USP 1 heterodimerinin bağlandığı belirlenmiştir. (Hiruma et., al, 1999).

Çalışmamızda kontrol grubunda ve juvenil hormon analogu fenoxycarb uygulanan gruplarda immunohistokimyasal olarak EcR B1 belirlenmiş ve juvenil hormonun ipek bezinin anterior kısmında EcR B1 üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin programlanmış hücre ölümünün meydana gelmesiyle de bağlantılı olması muhtemeldir.

4.5.1. Kontrol Grubu

Bombyx mori ipek bezinde yapılan çalışmalarda deri değişimi aralarındaki periyot boyunca EcR A; deri değişiminde ise EcR B1'in baskın olarak sentezlendiği belirlenmiştir. Juvenil hormonun ise özellikle EcR B1'in ortaya çıkış zamanını etkilediği bildirilmiştir (Riddiford et., al., 2001).

Kontrol grubunda ekdizon reseptörünün ortaya çıkışı 8. günde olmaktadır (Şekil 3.6c-d-e). 9. günde ipek bezi hücrelerinin nukleuslarında yoğun olarak belirlenen EcR B1 pupal deri değişiminin meydana geldiği 10. günden itibaren yoğunluğu azalmaya başlamıştır (Şekil 3.7c-d-e, 3.8c-d-e). Elde edilen sonuçlar bu günlerde belirlenmiş hormon miktarlarıyla bağlantılı olarak ele alındığında 20- ekdisteroidin EcR B1 üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. 7.günün ortalarında 20-E miktarında meydana

gelen artış EcR B1'in de artışına sebep olmuştur. Ancak 10. günde 20E hemolenfte 5. larval evre süresince en yüksek değerine ulaşarak larval-pupal deri değişimini uyarsa da bu 20E yükselişine rağmen EcR B1 miktarı azalmıştır. Buradan çıkan sonuç az miktarda 20E salınımının EcR B1'in ortaya çıkışını sağladığı yönündedir. 5.larval evre boyunca *Bombyx mori* kanat diskinde EcR mRNA'sının safhaya spesifik ekspresyonu belirlenmiştir. Bu evrenin 5. gününde ekspresyonun artmaya başladığı ve örme başlangıcında maksimum noktaya ulaştığı belirlenmiştir. Pupal safhanın hemen öncesinde ise hızlı bir şekilde düşüş gözlenmiştir (Kamimura et., all., 1996). Kanat disklerindeki bu durum ipek bezinde belirlediğimiz bulgularla benzerdir.

Hiruma et.al., (1997), Hegstrom et., all., (1998) yaptıkları çalışmada bir steroid hormonun, reseptörünün ekspresyonu üzerinde hem pozitif hem negatif etkilere sahip olabileceğini bildirmiştir. *Manduca sexta* larval epidermisinde hem ekdizonun hem de 20 hidroksiekdizonun, pupal kabullenme periyodu boyunca EcR B1 mRNA'sının düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Hegstrom et. al., (1998) yaptıkları çalışmada *Manduca sexta*'da, kaslarda, metamorfoz sırasında ekdizon reseptör ekspresyonunun kontrol mekanizmalarını araştırmışlardır. EcR B1'in pupa öncesi ekdisteroit pikinden önce yoğun bir ekspresyonu olduğu saptanmıştır. Ancak örme safhasının 3. günü artık EcR B1 belirlenemezken, EcR A ise belirlenebilir. Yapılan çalışmada hemolenfte bulunan ekdisteroit miktarının *Manduca*'da kaslarda EcR B1 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür.

Bizim elde ettiğimiz bulgularda da daha önce belirlenmiş hemolenfteki 20E konsantrasyonlarına bakıldığında 20E artışıyla EcR B1 artışı arasında bağlantı olduğu görülmektedir. *Manduca sexta* 5. (son) larval

evre epidermisinde yapılan bir çalışma ekdizon reseptör izoformlarının ekspresyonunun düşük konsantrasyonlardaki ekdizonla uyarıldığı gösterilmiştir. EcR B1'in ise EcR A'ya nazaran 2 misli düşük konsantrasyona yanıt verdiği bildirilmiştir (Riddiford et., al., 1999) Ancak kültür ortamında yapılan çalışmalar yüksek dozlarda ekdizon uygulamasının EcR B1 mRNA'sında gerilemeye neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, kontrol grubunda 10. günde elde ettiğimiz bulguların yani hemolenfte yüksek 20E bulunmasına rağmen EcR B1 yoğunluğunun hücrelerdeki azalışını açıklamaktadır.

Manduca sexta abdominal epidermisinde yapılan çalışmalar da ise EcR B1'in çoğunlukla düşük düzeyde bulunduğu ve yükselen ekdizon seviyesine tepki olarak EcR A mRNA'sında artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Bu durum ipek bezinin anterior kısmında belirlediğimiz sonuçlarla zıt görünmektedir. . (Riddiford et., al., 2001).

Kamimura et., al (1996). Kamimura et al., (1997) *Bombyx mori*'de yaptıkları çalışmada 5 larval evre boyunca EcR A ve EcR B1'in mRNA'larının ilk 6 gün düşük düzeyde olduğu ancak 6. günün ikinci yarısından itibaren artmaya başladığını göstermektedir. Ekspresyon en fazla örme öncesi gezinme anında yani 7. günün ikinci yarısında görülür ve 10. günden pupalaşmaya kadar düşmeye başlar. Bu bilgiler çalışmamızdaki immunohistokimyasal boyamalardan elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir. Aynı çalışmada her iki izoformun da transkripsiyonunun ekdisteroid miktarı 20ng/ml'ye yükseldiğinde görüldüğü ve ekdisteroid pikinden hemen önce azaldığı bildirilmiştir. Bu durum düşük konsantrasyonlardaki ekdisteroidlerin reseptörlerinin transkripsiyonunu

uyardığını göstermektedir. Ancak özellikle EcR B1'in uyarılması için ekdisteroid miktarının 100 ng/ml'nin üzerine çıkması gerektiği belirlenmiştir.

4.5.2. (0.Günde 1ng) Fenoxycarb Uygulaması

Bu uygulama grubunda ekdizon reseptör B1 (EcR B1)'in 8. ve 9. günlerde hücrelerde EcR B1 bulunmuştur (Şekil 3.13c-d-e, 3.14c-d-e). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 10. ve 11 günde bu uygulama grubunda EcR B1 belirlenememiştir (Şekil 3.15c-d-e, 3.16c-d-e). İlginçtir ki 12. günde EcR B1 yoğun olarak hücrelerde tekrar ortaya çıkmıştır (Şekil 3.17c-d-e). Bu artışın Kamimura and Kiuchi (1998) tarafından belirlenen hemolenfte 20E artışıyla birlikte meydana geldiği görülmektedir. 14. gün bez hücrelerinde ise EcR B1 belirlenememiştir (Şekil 3.19c-d-e). Bu grupta hemolenfte belirlenen küçük bir 20E artışı 10. gün meydana geldiği halde 8. ve 9. günlerde EcR B1'in belirlenmesi çok küçük miktardaki ekdizon salınımlarının olabileceği ihtimalini akla getirmektedir.

Manduca sexta epidermisinde yapılan çalışmada EcR A'nın juvenil hormondan etkilendiği, EcR B1'in ise etkilenmediği belirlenmiştir. Araştırmacılar ipek bezinin anterior kısmında ekdizon reseptörleri üzerine juvenil hormonun etkisinin belirlenmesi gerektiği tavsiyesinde bulunmuşlardır (Kamimura et al., 1997). Bu uygulama grubundan elde ettiğimiz sonuçlar *Manduca sexta* epidermisinde belirlenen durumdan farklıdır. Hücrelerde belirlenen EcR B1 düzeylerinin kontrol grubundan farklı olması juvenil hormonun EcR B1'in ortaya çıkışını etkilediğini göstermektedir.

Juvenil hormonun, düşük miktardaki 20-E varlığında EcR izoformlarının ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı *Manduca sexta* epidermisinde belirlenmiştir. Ancak yüksek miktardaki juvenil hormonun ekdizon reseptör miktarındaki artışı önleyebildiği gösterilmiştir. Kültür ortamına 1µg/ml JH1 uygulandığında ekdizon reseptör ekspresyonunun baskılandığı bildirilmiştir. (Hiruma et., all., 1999). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bizim 8 ve 9. günlerde belirlediğimiz EcR B1'in bulunma nedenini açıklayabilir.

4.5.3. (0. Günde 10 ng) Fenoxycarb Uygulaması

Bu uygulama grubunda EcR B1 8. günden itibaren hücre nukleuslarında belirlenmiştir (Şekil 3.21c-d-e). Özellikle 8. ve 9. günde yoğun olarak belirlenen EcR B1 yoğunluğu giderek azalsa da 13. güne kadar nukleuslarda görülmektedir. 0. günde 10 ng fenoxycarb uygulandığında hemolenfte görülen 20E miktarlarına ilişkin herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Ancak bu gruptaki hayvanların örme davranışı göstermemesi larval-pupal metamorfaza spesifik hemolenfte 20E artışlarının meydana gelmediğinin bir göstergesi olabilir. EcR B1'in ortaya çıkışının ekdizona bağlı olduğu göz önüne alınacak olursa bu durum biraz çelişkilidir. Ancak EcR B1'in ekspresyonu için düşük düzeyde 20E'nun gerekli olduğu ve 5. larval evrenin hemen başlangıcında yapılan uygulamanın 3. günde meydana gelen küçük ekdizon salınımına etkisinin olmaması bu sonucu açıklayabilir. Ancak 0. günde 10 ng fenoxycarb uygulamasının hemolenf 20E miktarında nasıl değişimler meydana getirdiği bilinmediği için kesin bir sonuca varmak zordur. Diğer bir ilginç sonuç hormon reseptörünün 13. güne kadar hücre nukleuslarında belirlenmesidir. Hiruma et., all., (1999) *Manduca*

sexta epidermisinde yaptıkları çalışmada juvenil hormon uygulamasının EcR B1 proteininin nukleusta yarı ömrünün uzamasına neden olduğunu belirlemişlerdir. Juvenil hormonun bunu gerçekleştirirken ya proteini daha fazla stabilize ettiği ya da translasyon oranını arttırdığı düşünülmektedir. Eğer aynı durum bu uygulama grubu için de geçerliyse, bu, 13. güne kadar nukleusta reseptörün bulunuşunu açıklayabilir.

Bununla bağlantılı olarak Thormeyer et., all., (1999) yaptıkları çalışmada ekdizon reseptörlerinin hormonun yokluğunda hücrenin nukleusunda lokalize olduğunu bildirmişlerdir.

4.5.4. (3. Günde 1 ng ve 10 ng) Fenoxycarb Uygulaması

3. günde yapılan her iki dozda uygulama sonucunda 5. larval evrenin 7. gününden 14. gününe kadar ipek bezi hücrelerinde EcR B1 belirlenememiştir. İmmunohistokimyasal olarak EcR B1'in belirlenememesinin hemolenfte bulunan 20E miktarlarıyla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Yine bir önceki uygulama grubunda olduğu gibi bu hayvanların 5. larval evrenin 14. gününe kadar örme davranışı göstermemesi hemolenf 20E miktarının pupal dönüşüm için gerekli olan miktardan çok daha az bulunduğunu göstermektedir. Bu uygulama grubunda EcR B1'in belirlenememesi juvenil hormon analogu fenoxycarb'ın 20E'nun salınımı engelleyerek EcR B1'in ortaya çıkışını engellediği ya da doğrudan EcR B1 üzerine etki ederek bu etkisini gerçekleştirdiği sonucuna varılabilir.

Sakurai et.,all., (1998) ve Takaki and Sakurai, (2003) *Bombyx mori*'de 5. larval evre süresince 3. günün ikinci yarısından itibaren ekdizon

miktarında meydana gelen yükselişin dokularda pupal kabullenme sürecini başlattıkları belirlenmiştir.

Buna göre 3. günün sabahında yapılan hormon uygulamasının 3. günün ikinci yarısında gerçekleşen 20E artışını engellediği düşünülebilir. Bu durum EcR B1'in ortaya çıkışını baskılamış olabilir. 3. gündeki küçük ekdizon salınımı hormon reseptörlerinin ortaya çıkışı için kritik olduğu düşünülmektedir.

Bir diğer olasılık da 3. günde yapılan uygulamanın 6. günün ikinci yarısında görülen ve Kamimura et., al. (1998)'de belirtildiği gibi EcR B1 miktarında artışına neden olan 20E artışının meydana gelmemesidir. Ancak bununla ilgili kesin bir hükme ulaşabilmek için 3. günde yapılan uygulama sonrasında hemolenf 20E konsantrasyonlarının bilinmesi gerekmektedir.

4.5.5. (6. Günde 1 ng ve 10 ng) Fenoxycarb Uygulaması

5. larval evrede, ipek bezinin anterior kısmının 7. günden 14. güne kadar histolojik yapısının incelemelerinde olduğu gibi EcR B1'in bulunma durumu açısından da bu günde yapılan uygulamaların kontrol grubuyla hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir. Özellikle 8. günden itibaren yoğun bir şekilde belirlenen EcR B1 10. günden itibaren yoğunluğu azalmış ve belirlenemez düzeye gelmiştir. Tüm bu bulgular bu günde yapılan fenoxycarb uygulamasının EcR B1 üzerinde etkisi olmadığını göstermektedir. Kamimura and Kiuchi (1998) yaptıkları uygulamada 6. günden itibaren hayvanların fenoxycarb'a dolayısıyla juvenil hormona hassasiyetlerini kaybettiklerini bildirmişlerdir. EcR B1 ortaya çıkışı yönünden elde ettiğimiz sonuçlar bu bilgiyle uyum göstermektedir. EcR B1 yoğunluğunda kontrolden farklı bir

değişimin olmaması bu günde uygulanan fenoxycarb'ın etkisinin olmadığını göstermektedir. Her ne kadar 6. günde fenoxycarb uygulanan hayvanlardaki 20E miktarlarına ilişkin bir yayın bulunmasa da bu grup hayvanların kontrol grubuyla aynı 5. larval evre gelişimini göstermeleri fenoxycarb'ın 20E miktarında herhangi bir farklılık yaratmadığını ortaya koymaktadır. Bu evrede EcR B1 yoğunluğunun kontrol grubuyla aynı olmasının nedeni 20E'nun miktarının değişmemesinden kaynaklanabilir.

Tüm gruplara ait bulgulardan elde edilen sonuçlar juvenil hormon analogu fenoxycarb'ın uygulama zamanına ve uygulanan doza bağlı olarak *Bombyx mori*'de ipek bezinin anterior kısmında meydana gelen programlanmış hücre ölümünü engellediğini göstermektedir. 5. larval evre süresince fenoxycarb'a en hassas olan günün 3. gün olduğu; 0. gün uygulamalarında uygulanan dozun önemli olduğu ve 6. günün ise fenoxycarb uygulamasına hassas olmadığı belirlenmiştir. 0. gün ve 3. günde yapılan uygulamalarda larval evrenin uzadığı; 0. günde 10 ng ve 3. günde yapılan her iki uygulamada larval karakterlerin devamlı hale geldiği ve bu hayvanların larval-pupal dönüşümü gerçekleştirmediği gösterilmiştir.

Pupal dönüşüm sırasında larvaya ait olan dokular programlanmış hücre ölümü yoluyla dejenere olurlar. Bu dokulardan birisi de ipek bezinin anterior kısmıdır. Bundan dolayı pupal değişimin gerçekleşmemesi ipek bezinde meydana gelen programlanmış hücre ölümününün meydana gelmemesi anlamına gelebilir.

4.6 DNA Elektroforez Sonuçları

Apoptozisin en belirgin biyokimyasal işareti, internukleozomal bölgedeki çift iplikli DNA'nın endojen DNase'lar tarafından 180-200 baz çiftlik kırıklara indirgenmesidir (Majno and Joris, 1995; Saraste, 1999; Dinsdale et., all., 1999; Saraste and Pulkki, 2000). Bu kırıklar DNA jel elektroforezinde gösterilmiş ve apoptozisin en önemli biyokimyasal işareti olmuştur (Saraste, 1999; Dinsdale et., all., 1999; Saraste and Pulkki, 2000;).

Kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezinde incelenmesiyle programlanmış hücre ölümü biyokimyasal olarak da belirlenmiştir.

Kontrol grubunda DNA 7.,8., ve 9., günlerde tek bir band halinde görülmektedir. Pupalaşmanın meydana geldiği 10. günde ise programlanmış hücre ölümünün göstergesi kırıklı DNA yapısı belirlenmiştir (Şekil 3.58). Terashima et., all.,2000, *Bombyx mori*'de ipek bezinin anterior kısmında aynı dönemde yaptıkları DNA elektroforezinde pupa deri değişiminin meydana geldiği günde DNA'da kırıklı yapıyı belirlemişlerdir. Bizim bulgularımız da bu yöndedir. Müller et., all., 2004, *Manduca sexta* yağ dokusunda programlanmış hücre ölümünü gösterdikleri çalışmada; yağ dokusunda meydana gelen programlanmış hücre ölümü tipinin otofajik tipte olduğunu ve DNA kırıklarının son larval evrede gezinme safhasının başlangıcında meydana geldiğini belirtmişlerdir. Dai and Gilbert, 1999'da *Manduca sexta* protorasik bezinde yaptıkları çalışmada 20E'nun programlanmış hücre ölümünde DNA kırıklarının meydana gelmesine neden olduğunu göstermişlerdir. *Bombyx mori*'de ipek bezinin anterior kısmında da

programlanmış hücre ölümünde DNA kırıklarının meydana gelmesinden 20E sorumludur (Terashima et., all.,2000).

0.günde 1 ng ve 10 ng fenoxycarb uygulanan grupta DNA elektroforezlerinde 7. günden 14. güne kadar DNA'da kırıklı yapının meydana gelmediği görülmüştür (Şekil 3.59, 3.60). Dai and Gilbert, 1998'de *Manduca sexta*'da yaptıkları çalışmada pupal safhanın 0. gününde 5µg juvenil hormon II uygulamışlar; pupal safhanın 1. gününden 11. gününe kadar DNA elektroforezi yapmışlar ve juvenil hormon uygulanan grupta DNA kırıklarının meydana gelmediğini göstermişlerdir.

3.günde 1 ng ve 10 ng uygulama yapılan grupta da 7. günden 14. güne kadar DNA'da kırıklı yapı belirlenmemiştir (Şekil 3.61, 3.62). Bu grup hayvanların ipek bezlerinin anterior kısımlarında morfolojik olarak da programlanmış hücre ölümüne ait belirti görülmemiştir. DNA kırıklarının belirlenmemesi de bunu doğrulamaktadır.

6. günde 1 ng ve 10 ng uygulama yapılan grupta elde edilen sonuçlar kontrol grubuyla aynıdır. 7., 8., ve 9. günlerde DNA tek band halinde ve bozulmamış olarak belirlenmiş; pupalaşmanın meydana geldiği 10. günde DNA'da kırıkların meydana geldiği görülmüştür (Şekil 3.63, 3.64). Bu uygulama gruplarında kontrol grubuyla benzer morfolojilerin belirlenmesinin yanında DNA kırıklarının da aynı zamanda meydana gelmesi programlanmış hücre ölümünün kontrol grubuyla eş zamanlı olarak ilerlediğini göstermektedir.

Daha önce yapılmış çalışmalara dayanılarak ve bizim yapmış olduğumuz çalışmadan da çıkan sonuç juvenil hormonun etkisini hormon

reseptörü üzerinde ya da ekdizon hormonunun salınımı etkileme yoluyla gösterebileceği yönündedir. 0. Günde 1 ng uygulaması sonrasında Kamimura and Kiuchi (1997) tarafından belirlenen hemolenfteki 20E miktarı ve bizim bez hücrelerinde belirlediğimiz Ecr B1 yoğunluğunun günlere göre değişiminin 20E ile korelasyon göstermesi bunu doğrulamaktadır. 3. gündeki uygulamaların programlanmış hücre ölümünü engellemesi de fenoxycarb'ın 3. gündeki ve 6. gündeki 20E salınımlarını engellediğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Abraham, M., C. and Shaham, S., 2004, Death without Caspases, Caspases without Death. *Trends in Cell Biology*, Vol. 14, No.4.
- Akai, H., 1998, Silk Glands. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, volume, 11A: Insecta, 219-253
- Alnemri E.S., 1999, Hidden Powers of Mitochondria. *Nature Cell Biology* **1**, E40 - E42.
- Azuma, M., and Ohta, Y., 1998, Changes in H⁺- Translocating Vacuolar –Type ATPase in the Anterior Silk Gland Cell of *Bombyx mori* During Matemorphosis. *The Journal of Experimental Biology*, 201, 479-486.
- Baehrecke, EH., 2000, Steroid Regulation of Programmed Cell Death During *Drosophila* Development. *Cell Death and Differentiation*, 7, 1057-1062.
- Baehrecke, EH., 2003, Autophagic Programmed Cell Death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, 10, 940-945.
- Bothe G W. M. and Rathmayer W., 1994, Programmed degeneration of thoracic eclosion muscle in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Journal of Insect Physiology*, Volume 40, Issue 11, Pages 983-995.
- Bursch, W., 2004, Multiple Cell Death Programs: Charon's Lifts to Hades. *FEMS Yeast Research*, 5 , 101-110.

KAYNAKLAR (devam)

- Cakouros D., Daish T. J., Kumar S., 2004, Ecdysone Receptor Directly Binds the Promoter of the *Drosophila* caspase *dronc*, Regulating its Expression in Specific Tissues. *The Journal of Cell Biology*, vol.165, no:5, 631-640.
- Capella, I.,C., and Hartfelder, K., 1998, Juvenile Hormone Effect on DNA Synthesis and Apoptosis in Caste-Specific Differentiation on the Larval Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Ovary. *Journal of Insect Physiology* 44, 385-391.
- D'avino P. P., Thummel C. S., 2000, The Ecdysone Regulatory Pathway Controls Wing Morphogenesis and Integrin Expression during *Drosophila* Metamorphosis. *Developmental Biology*, 220, 211-224.
- Dai, j., Gilbert, L., I., 1998, Juvenile Hormone Prevents the Onset of Programmed Cell Death in the Prothoracic Glands of *Manduca Sexta*. *General and Comparative Endocrinology*, 109, 155-165.
- Dai, j., Gilbert, L., I., 1999, An in Vitro Analysis of Ecdysteroid-Elicited Cell Death in the Prothoracic Gland of *Manduca Sexta*. *Cell Tissue Res.* 297:319-327.
- Davey K. G., 2000, The modes of Action of Juvenile Hormones: Some Questions We Ought to Ask. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 663-669.

KAYNAKLAR (devam)

- Dedos S. G., Fugo H., 1996, Effects of Fenoxycarb on the Secretory Activity of the Prothoracic Glands in the Fifth Instar of the Silkworm, *Bombyx mori*. *General and Comparative Endocrinology*, 104, 213-224.
- Dedos S. G., Fugo H., 1999, Disturbance of Adult Eclosion by Fenoxycarb in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 45, 257-264.
- Dedos S. G., Fugo H., 1999, Downregulation of the cAMP Signal Transduction Cascade in the Prothoracic Glands is Responsible for the Fenoxycarb-mediated Induction of Permanent 5th Instar Larvae in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 723-729.
- Dedos S. G., Fugo H., 1999, Induction of Dauer Larvae by Application of Fenoxycarb Early in the 5th Instar of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 45, 769-775.
- Dedos S. G., Szurdoki F., Szekacs A., Mizoguchi A., Fugo H., 2002, Induction of Dauer Pupae by Fenoxycarb in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 48, 857-865.
- Dedos S. G., Szurdoki F., Székács A., Shiotsuki T., Hammock B. D., Shimada J., and Fugo H., 2002, Fenoxycarb levels and their effects on general and juvenile hormone esterase activity in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Volume 73, Issue 3, July 2002, Pages 174-187.

KAYNAKLAR (devam)

- Dubrovsky E. B., 2005, Hormonal Cross Talk in Insect Development. Trends in Endocrinology and Metabolism, Vol. 16, Issue. 1, pp. 6-11.
- Dwahan, S. and Gopinathan, K.P., 2003, Cell Cycle Events during the Development of the Silk Glands in the Mullberry Silkworm *Bombyx mori*. Dev. Genes Evol., 213: 435-444.
- Elmogy, M., Iwami, M., Sakurai, S., 2004, Presence of Membrane Ecdysone Receptor in the Anterior Silk Gland of the Silkworm *Bombyx mori*. Eur. J. Biochem. 271, 3171-3179.
- Fujiwara, H., and Ogai, S., 2001, Ecdysteroid-Induced Programmed Cell Death and Cell Proliferation During Pupal Wing Development of the Silkworm, *Bombyx mori*. Dev. Genes. Evol. 211:118-123.
- Gilbert L. I., Song Q., Rybczynski R., 1997, Control of Ecdysteroidogenesis: Activation and Inhibition of Prothoracic Gland Activity. Invertebrate Neuroscience, 3, 205-216.
- Gu S., Chow Y, Yin C., 1996, Involvement of Juvenile Hormone in Regulation of Prothoracicotropic Hormone Transduction during the Early Last Larval Instar of *Bombyx mori*. Molecular and Cellular Endocrinology, 127, 109-106.
- Guimarães C. A., Linden R., 2004, Programmed cell deaths. Eur. J. Biochem., 271, 1638-1650.

KAYNAKLAR (devam)

- Guimaraes, C., A., and Linden, R., 2004, Programmed Cell Death. Apoptosis and Alternative Deathstyles. Eur. J. Biochem. 271. 1638-1650.
- Halaby R, Sutherland K. (2002). Detection of early apoptotic events in the labial gland of *Manduca sexta* in response to 20-hydroxyecdysone. Lepidoptera J 6:75-81.
- Halaby R., Martinez, Martinez M., L., Lockshin, R., A., Zakeri, Z., 1998, 20-Hydroxyecdysone Induces Apoptosis in the Labial Gland of *Manduca sexta*. Journal of Research on the Lepidoptera, 37:3-10.
- Hall, B. L. and Thummel, C. S., 1998, The RXR homolog Ultraspiracle is an Essential Component of the *Drosophila* Ecdysone Receptor. Development, 125, 4709-4717.
- Hegstrom C., D., Riddiford L., M., Truman J., W., 1998, Steroid and Neuronal Regulation of Ecdysone Receptor Expression during Metamorphosis of Muscle in the Moth, *Manduca sexta*. The Journal of Neuroscience, March 1., 18(5):1786-1794.
- Hiruma K., Böcking D., Lafont R., Riddiford L., M., 1997, Action of Different Ecdysteroids on the Regulation of mRNAs for the ecdysone Receptor, MHR3, Dopa Decarboxylase, and a Larval Cuticle Protein in the Larval Epidermis of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. General and Comparative Endocrinology, 107, 84-97.

KAYNAKLAR (devam)

- Hiruma K., Shinoda T., Malone F., Riddiford L., M., 1999, Juvenile Hormone Modulates 20-Hydroxyecdysone-Inducible Ecdysone Receptor and Ultraspiracle Gene Expression in the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Genes Evol.*, 209:18-30.
- Hoffman K. L., Weeks J. C., 2001, Role of Caspases and Mitochondria in the Steroid Induced Programmed Cell Death of a Motoneuron during Mematorphosis. *Developmental Biology*, 229, 517-536.
- Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M., 1997, Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell*, Vol.88, 347-354.
- Jiang C., Lamblin A. J., Steller H., Thummel C. S., 2000, A Steroid-Triggered Transcriptional Hierarchy Controls Salivary Gland Cell Death during *Drosophila* Metamorphosis. *Molecular Cell*, Vol.5, 445-455.
- Jindra M., Riddiford L., M., 1996, Expression of Ecdysteroid-Regulated Transcripts in the Silk Gland of the Wax Moth *Galleria mellonella*. *Dev. Genes Evol*, 206:305-314.
- Jochova J., Quaglino, D., Zakeri Z., Woo K., Sikorska M., Weaver V., Lockshin R. A., 1997, Protein Synthesis, DNA Degradation, and Morphological Changes during Programmed Cell Death in Labial Glands of *Manduca sexta*. *Developmental Genetics*, 21:249-257.

KAYNAKLAR (devam)

- Jones M E. E., Haire M. F., Kloetzel P. M., Mykles D. L. and Schwartz L. M., 1995, Changes in the Structure and Function of the Multicatalytic Proteinase (Proteasome) during Programmed Cell Death in the Intersegmental Muscles of the Hawkmoth, *Manduca sexta*. *Developmental Biology*, Volume 169, Issue 2, June 1995, Pages 436-447.
- Takei M., Iwami M., Sakurai S., 2004, Death Commitment in the Anterior Silk Gland of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, Volume 51, Issue 1, January 2005, Pages 17-25
- Takei, M., Iwami, M., Sakurai, S., 2005, Death commitment in the Anterior Silk Gland of the Silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 51:17-25.
- Kamimura M., Tomita S., Fujiwara H., 1996, Molecular Cloning of an Ecdysone Receptor (B1 Isoform) Homologue from the Silkworm, *Bombyx mori*, and its mRNA Expression during Wing Disc Development. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.113B, No. 2, pp. 341-347.
- Kamimura M., Tomita S., Kiuchi M., Fujiwara H., 1998, Tissue-Specific and Stage-Specific Expression of Two Silkworm Ecdysone Receptor Isoforms. Ecdysteroid-Dependent Transcription in Cultured Anterior Silk Glands. *Eur. J. Biochem.*, 248, 786-793.
- Kamimura, M. And Kiuchi, M, 1998, Effects of a Juvenile Hormone Analog, Fenoxycarb, on 5th Stadium of the Larvae of the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera:Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 33 (2): 333-338.

KAYNAKLAR (devam)

- Kamimura, M., 1995, Effects of a Juvenile Hormone Analogue, Fenoxycarb, on Larval Growth of the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 30 (3):487-489
- Kamimura, M., Takahashi, M., Tomita, S., Fujiwara, H. and Kiuchi, M., 1999, Expression of Ecdysone Receptor Isoforms and Trehalase in the Anterior Silk Gland of *Bombyx mori* During Extra Larval Molt and Precocious Pupation Induced by 20-Hydroxyecdysone Administration. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 41:79-88.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* Aug;26(4):239-57.
- Kiess, W, and Gallaher, B., 1998, Hormonal Control of Programmed Cell Death/ Apoptosis. *European Journal of Endocrinology*, 138, 482-491.
- Kobayashi M and Ishikawa H., 1993, Mechanisms of histolysis in indirect flight muscles of alate aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Journal of Insect Physiology*, Volume 40, Issue 1, Pages 33-38.
- Kodrik D., and Sehnal, F., 1994, Juvenile Hormone Counteracts the Action of Ecdysterone on Silk Glands of *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera: Pyralidae*). *Int. J. Insect Morphol.&Embryol.*, Vol. 23, No:1, pp. 39-56.

KAYNAKLAR (devam)

- Kodrik, D and Sehanl, F., 1994, Juvenile Hormone Counteracts the Action of Ecdysterone on Silk Glands of *Galleria Mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* Vol.23, No.1, pp. 39-56.
- Kucharova S., Farkas R., 2002, Hormone Nuclear Receptors and Their Ligands: Role in Prpgrammed Cell Death. *Endocrine Regulations*, Vol.36, 37-60.
- Kuchárová-Mahmood S., Raksa I., Mechler B. M. and Robert Farkas, 2002, Temporal regulation of *Drosophila* salivary gland degeneration by the *Broad-Complex* transcription factors. *Journal of Structural Biology*, Volume 140, Issues 1-3, October 2002, Pages 67-78.
- Langelan R. E., Fisher J. E., Hiruma K., Palli S. R., Riddiford L. M., 2000, Patterns of MHR3 Expression in the Epidermis during a Larval Molt of the Tobacco Hornworm *Manduca sexta*. *Developmental Biology*, 227, 481-494.
- Larsen K. E., Sulzer D., 2002, Autophagy in Neurons: A Review. *Histol. Histopathol.* 17.
- Lee C. Y., Cooksey B. A. K., Baehrecke E. H., 2002, Steroid Regulation of Midgut Cell Death during *Drosophila* Development. *Developmental Biology*, 250, 101-111.

KAYNAKLAR (devam)

- Lee C., Simon C. R., Woodard C. T., Baehrecke E. H., 2002, Genetic Mechanism for the Stage- and Tissue Specific Regulation of Steroid Triggered Programmed Cell Death in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 252, 138-148.
- Lee C., Y., Baehrecke E., H., 2001, Steroid Regulation of Autophagic Programmed Cell Death during Development. *Development*, 128, 1443-1455.
- Lee T., Marticke S., Sung C., Robinow S., Luo L., 2000, Cell-Autonomous Requirement of the USP/EcR-B Ecdysone Receptor for Mushroom Body Neuronal Remodelling in *Drosophila*. *Neuron*, Vol. 28, 807-818.
- Leonardi M. G. Cappelozza S., Ianne P., Cappelozza L., Parentis P., Giordina B., 1996, Effects of the Topical Application an Insect Growth Regulator (Fenoxycarb) on Some Physiological Parameters in the Fifth Instar Larvae of the Silkworm *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 113B, No:2, pp.361-365.
- Levine R. B., Morton D., B. and Restifo L., L., 1995, Remodeling of the insect nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, Volume 5, Issue 1, Pages 28-35.
- LM Schwartz, L Kosz and BK Kay, 1990, Gene Activation is Required for Developmentally Programmed Cell Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 87, 6594-6598.

KAYNAKLAR (devam)

- Lockshin, R., A. and Zakeri, Z., 2004, Apoptosis, Autophagy, and More. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36, 2405-2419.
- Löw P., Bussell K., Dawson S., P., Billett M., A., Mayer R., J. and Reynolds S. E., 1997, Expression of a 26S proteasome ATPase subunit, MS73, in muscles that undergo developmentally programmed cell death, and its control by ecdysteroid hormones in the insect *Manduca sexta*. FEBS Letters, Volume 400, Issue 3, 6 January 1997, Pages 345-349.
- Löw P., Talian G. C., Mass M., 2005, Up and Downregulated Genes in Muscles that Undergo Developmentally Programmed Cell Death in the Insect *Manduca sexta*. FEBS Letters, 579, 4943-4948.
- Majno G. and Joris I., 1995, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. American Journal of Pathology, Vol 146, 3-15.
- Martin, D., N., and Baehrecke E., H., 2003, Caspases Function in Autophagic Programmed Cell Death in *Drosophila*. Development, 131, 275-284.
- Matsuura , S., Morimoto, T., Nagata, S. and Tashiro, Y., 1968, Studies on the Posterior Silk Gland of the Silkworm, *Bombyx mori* II. Cytolytic Process in Posterior Silk Gland Cells during Metamorphosis from Larva to Pupa. The Journal of Cell Biology, Vol:38. 589-603.
- Mengubas K., Fahey A., A., Lewin J., Mehta A., B., Hoffbrand A. V. and Wickremasinghe R. G., 1999, Killing of T Lymphocytes by Synthetic Ceramide Is by a Nonapoptotic Mechanism and Is Abrogated Following

KAYNAKLAR (devam)

- Mitogenic Activation. *Experimental Cell Research*, Volume 249, Issue 1, Pages 116-122.
- Mills E. M., Gunasekar P., G., Li L., Borowitz J. L. and Isom G., E., 1999, Differential Susceptibility of Brain Areas to Cyanide Involves Different Modes of Cell Death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 156, Issue 1, Pages 6-16.
- Mizoguchi A., Ohashi Y., Hosoda K., Ishibashi J., Kataoka H., 2001, Developmental Profile of the Changes in the Prothoracicotropic Hormone Titer in Hemolymph of the Silkworm *Bombyx mori*: Correlation with Ecdysteroid Secretion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 349-358.
- Monconduit H., Mauchamp B., 1998, Effects of Ultralow Doses of Fenoxycarb on Juvenile Hormone-Regulated Physiological Parameters in the Silkworm, *Bombyx mori* L. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 37:178-189.
- Monconduit H., Mauchamp B., 1999, Fenoxycarb, a Potent Contaminant of the Silkworm *Bombyx mori* L., Does Not Influence Its Juvenile Hormone Titer. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 40: 141-149.
- Müller, F., Adori, C., Sass, M., 2004, Autophagic and Apoptotic Features during Programmed Cell Death in the Fat Body of the Tobacco Hornworm (*Manduca sexta*).

KAYNAKLAR (devam)

- Nimi S., Sakurai S., 1997, Developmental Changes in Juvenile Hormone and Juvenile Hormone Acid Titters in the Hemolymph and in vitro Juvenile Hormone Synthesis by Corpora Allata of the Silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., Vol.43, No:9, pp. 875-884.
- Okuda M., Sakurai S., Ohtaki T., 1985, Activity of the Prothoracic Gland and its Sensitivity to Prothoracicotropic Hormone in the Penultimate and Last-Larval Instar of *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. Vol.31, No:6, pp. 455-461.
- Perdrix-Gillot S., 1979, DNA Synthesis and Endomitoses in the Giant Nuclei of the Silk Gland of *Bombyx mori*. Biochimie, 61(2):171-204.
- Riddiford L. M., Cheerbas P., Truman J. W., 2001, Ecdysone Receptors and Their Biological Actions. Vitamins and Hormones, Vol. 60.
- Riddiford L. M., Hiruma K., Lan Q., Zhou B., 1999, Regulation and Role of Nuclear Receptors during Larval Molting and Metamorphosis of Lepidoptera. American Zoologist, 39:736-746.
- Riddiford L. M., Hiruma K., Zhou X., Nelson C. A., 2003, Insights into the molecular Basis of the Hormonal Control of Molting and Metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33, 1327-1338.

KAYNAKLAR (devam)

- Sakurai S., 1990, Hormonal Mechanism Underlying the Switch in the Response of the Prothoracic Gland to Juvenile Hormone. *Advances in Invertebrate Reproduction* 5.
- Sakurai S., Kaya M., Satake S., 1998, Hemolymph Ecdysteroid Titer and Ecdysteroid-Dependent Developmental Events in the Last-Larval Stadium of the Silkworm, *Bombyx mori*: Role of Low Ecdysteroid Titer in Larval-Pupal Metamorphosis and Reappraisal of the Head Critical Period. *Journal of Insect Physiology*, 44, 867-881.
- Sakurai S., Okuda M., Ohtaki T., 1989, Juvenile Hormone Inhibits Ecdysone Secretion and Responsiveness to Prothoracicotropic Hormone in Prothoracic Glands of *Bombyx mori*. *General and Comparative Endocrinology*, 75, 22-230.
- Saraste A. and Pulkki K., 2000, Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, Volume 45, Issue 3, Pages 528-537.
- Schwartz, L., M., Smith, S., W., Jones., M.,E., Osborne., B., A., 1993, Do All Programmed Cell Death Occur Via Apoptosis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90, pp. 980-984
- Sehnal F., 1984, The Juvenile Hormone of Insects. *Nova Acta Leopoldina* NF 56, Nr.255, 251-266.

KAYNAKLAR (devam)

- Sehnal, F., and Michalik, J., 1984, Control of activity and Regression of the Silk Glands in the Last-Larval Instar of *Galleria Mellonella*. *J. Insect Physiol.* Vol. 30, No. 2, pp, 119-126.
- Shirai Y., Aizono Y., Iwasaki T., Yanagida A., Mori H., Sumida M., Matsubara F., 1993, Prothoracicotropic Hormone is Released Five Times in the 5th-Larval Instar of the Silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 39, 83-88.
- Siaussat D., Bozzolan F., Queguiner I., Porcheron P., Debernad S., 2004, Effects of Juvenile Hormone on 20-Hydroxyecdysone-Inducible EcR, HR3, E75 Gene Expression in Imaginal Wing Cells of *Plodia interpunctella* *Lepidoptera*. *Eur. J. Biochem.*, 271, 3017-3027.
- Song Q., Alnemri E. S., Litwack G., Gilbert L. I., 1998, An Immunophilin is a Component of the Insect Ecdysone Receptor (EcR) Complex. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, vol.27, No.11, pp. 973-982.
- Streichert L. C., Pierce J. T., Nelson J. A., Weeks J. C., 1997, Steroid Hormones Act Directly to Trigger Segment-Specific Programmed Cell Death of Identified Motoneurons of *In vitro*. *Developmental Biology*, 183, 95-107.
- Sudhakar, B and Gopinathan, K., P., 2000, Expression of Cyclin E in Endomitotic silk Gland Cells from Mulberry Silkworm. *Gene*, Oct 17, 257(1), 77-85.

KAYNAKLAR (devam)

- Sun D., Sathyanarayana U., G., Johnston S., A. and Schwartz L., M., 1996, A Member of the Phylogenetically Conserved CAD Family of Transcriptional Regulators Is Dramatically Up-Regulated during the Programmed Cell Death of Skeletal Muscle in the Tobacco Hawkmoth *Manduca sexta*. *Developmental Biology*, Volume 173, Issue 2, 1 February 1996, Pages 499-509.
- Sung C., Robinow S., 2000, Characterization of the Regulatory Elements Controlling Neuronal Expression of the A-Isoform of the Ecdysone Receptor Gene of *Drosophila melanogaster*. *Mechanism of Development*, 91, 237-248.
- Tata J., R., 2000, Autoinduction of Nuclear Hormone Receptors during Metamorphosis and its Significance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 645-651.
- Terashima J. Yasuhara N., Iwami M., Sakurai S., 2000, Programmed Cell Death Triggered by Insect Steroid Hormone, 20-Hydroxyecdysone, in the Anterior Silk Gland of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.*, 210:545-558.
- Thormeyer D., Tenbaum S., P., Renkawitz R., Baniahmad A., 1999, EcR Interacts with Corepressors and Harbours an Autonomous Silencing Domain Functional in Both *Drosophila* and *Vertebrate* Cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 68, 163-169.

KAYNAKLAR (devam)

- Truman, J., W., Thorn, R., S., and Robinow S., 1992, Programmed Neuronal Death in Insect Development. *Journal of Neurobiology*, Vol.23, No. 9, pp. 1295-1311.
- Vander Heiden M. G. and Thompson C. B., 1999, Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology* **1**, E209 - E216
- Verras M., Gourzi P., Zacharopoulou A., Mintzas A., C., 2002, Developmental Profiles and Ecdysone Regulation of the mRNAs for Two Ecdysone Receptor Isoforms in the mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 11(6), 553-565.
- Weber R., 1969, The isolated tadpole tail as a model system for studies on the mechanism of hormone-dependent tissue involution. *General and Comparative Endocrinology*, Volume 2, Supplement 2, Pages 408-416.
- Weeks, J., C., 2003, Thinking Globally, Acting Locally: Steroid Hormone Regulation of the Dendritic Architecture, Synaptic Connectivity and Death of Individual Neuron. *Progress in Neurobiology*, 70, 421-442.
- Wheeler D. E., Nijhout H. F., 2003, A Perspective for understanding the Modes of Juvenile Hormone Action as a Lipid Signaling System. *BioEssays*, 25:994-1001.

KAYNAKLAR (devam)

- Wilson T. G., 2004, The Molecular Site of Action of Juvenile Hormone and Juvenile Hormone Insecticides during Metamorphosis: How These Compounds Kill Insects. *Journal of Insect Physiology*, 50, 11-121.
- Yin V. P., Thummel C. S., 2005, Mechanism of Steroid Triggered Programmed Cell Death in *Drosophila*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16, 237-245.
- Yu L. C., Baehrecke E. H., 2000, Genetic Regulation of Programmed Cell Death in *Drosophila*. *Cell Research*, 10, 193-204.
- Zee M. C. and Weeks J. C., 2001, Developmental Change in the Steroid Hormone Signal for Cell-Autonomous, Segment-Specific Programmed Cell Death of a Motoneuron. *Developmental Biology*, Volume 235, Issue 1, 1 July 2001, Pages 45-61.

ÖZGEÇMİŞ

06.11.1976 tarihinde Ankara'da doğdum. İlk ve orta öğretimimi İzmir'de tamamladıktan sonra 1993 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladım. 1997 yılında lisans, 2000 yılında yüksek lisans eğitimini aynı birimde tamamladım. 2000 yılında araştırma görevlisi olarak E. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde göreve başladım. Görevime halen devam etmekteyim. Evli ve bir kız çocuğu annesiyim