

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ZOOLOJİ BİLİM DALI**

***GALLERIA MELLONELLA* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)
YAĞ DOKUSUNDA PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNE
JUVENİL HORMON ANALOGU FENOKSİKARB'IN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esen POYRAZ TINARTAŞ

**Danışman
Prof. Dr. Kamil KOÇ**

**II. Danışman
Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ**



MANİSA-2018

**Esen
POYRAZ
TINARTIŞ**

**GALLERIA MELLONELLA (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) YAĞ DOKUSUNDA
PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNE JUVENİL HORMON ANALOGU
FENOKSİKARBİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

2018

TEZ ONAYI

Esen POYRAZ TINARTAŞ tarafından hazırlanan "*Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Yağ Dokusunda Programlanmış Hücre Ölümüne Juvenil Hormon Analogu Fenoksikarb'ın Etkisinin Araştırılması" adlı tez çalışması 27/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Prof. Dr. Kamil KOÇ**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

II. Danışman **Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ**
Ege Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Hüseyin ARIKAN**
Ege Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Erdal BALCAN**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Beyhan GÜRCÜ**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Murat AFSAR**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Dr. Öğr. Üye. Gamze TURGAY İZZETOĞLU**
Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Esen POYRAZ TINARTAŞ



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLO DİZİNİ	VIII
TEŞEKKÜR	IX
ÖZET	X
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Galleria mellonella</i> 'nın Biyolojisi	4
2.2. Programlanmış Hücre Ölümü	5
2.2.1. Apoptoz	6
2.2.1.1. Apoptozisin Başlatılması	7
2.2.1.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu	7
2.2.1.2.1. Kaspaz-3' ün Apoptozisdeki Yeri ve Önemi	8
2.2.1.3. Hücre İçi Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler	9
2.2.1.3.1. Morfolojik Değişiklikler	9
2.2.1.3.2. Biyokimyasal Değişiklikler	9
2.2.1.4. Fagositoz	10
2.2.2. Otofaji	10
2.3. Yağ Doku ve Programlanmış Hücre Ölümü	14
2.4. Böcek Hormonları	16
2.4.1. Ekdisteroidler	16
2.4.1.1. Ekdizon Reseptörleri	18
2.4.2. Juvenil Hormon	19
2.5. Fenoksikarb	21
2.6. Tezin Amacı	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi	24
3.1.2. Deney Hayvanlarının Yetiştirilmesi	24
3.1.3. Larvaların Gelişim Safhalarına Ayrılması	27
3.1.4. Fenoksikarb	29
3.2. Yöntemler	29
3.2.1. Juvenil Hormon Analogu Fenoksikarbin Uygulanması	29

3.2.2. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi.....	30
3.2.3. Yağ Dokunun Elde Edilmesi	30
3.2.4. Yağ Dokunun Histolojisi.....	30
3.2.5. Otofajik Vakuollerin Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Belirlenmesi	32
3.2.6. DNA Fragmentasyonunun TUNEL Yöntemiyle Belirlenmesi	33
3.2.7. Spesifik Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	35
3.2.8. Spesifik Asit Fosfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	38
3.2.9. Ekdizon Reseptörü EcR-B1'in Western Blotting ile Belirlenmesi.....	39
3.2.10. Verilerin İstatistiksel Analizi	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	45
4.1. Araştırma Bulguları.....	45
4.1.1. Son Larval Evre Üzerine Fenoksikarbın Etkileri	45
4.1.2. Vücut Ağırlıklarında Görülen Değişimler	49
4.1.3. Histolojik ve Sitolojik Bulgular	51
4.1.4. Hücre Boyutlarına İlişkin Bulgular ve İstatistiksel Değerlendirme	76
4.1.5. TUNEL Bulguları.....	78
4.1.6. Spesifik Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Bulguları.....	83
4.1.7. Total Protein Miktarı Bulguları	85
4.1.8. Spesifik Asit Fosfataz Enzim Aktivitesi Bulguları.....	86
4.1.9. Western Blotting ile EcR-B1'in Belirlenmesine İlişkin Bulgular	89
4.1.9.1. Kontrol Grubu Bulguları	89
4.1.9.2. 5 µg Fenoksikarb Uygulama Grubu Bulguları.....	90
4.2. Tartışma.....	95
4.2.1. Son Larval Evre Üzerine Fenoksikarbın Etkileri	95
4.2.2. Vücut Ağırlıklarında Görülen Değişimler	100
4.2.3. Yağ dokunun Histolojik ve Sitolojik Yapısı Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
4.2.4. Total Protein Miktarı Değişimleri.....	106
4.2.5. Yağ Dokuda Programlanmış Hücre Ölümü.....	109
4.2.5.1. Apoptoz	113
4.2.5.2. Otofaji	116
4.2.6. Yeniden Şekillenme Sürecinde EcR-B1 ile Bağlantılı Olarak Ekdizonun Muhtemel Roller ve Fenoksikarb'ın Etkisi..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	135
KAYNAKLAR	138
ÖZGEÇMİŞ.....	153

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

20HE	: 20-Hidroksiekdizon
APAF-1	: ATP Varlığında Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör
ATG	: Otofaji İlişkili Gen
BD	: Bağ Doku
BM	: Bazal Membran
CAD	: Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz Enzimi
DAPI	: 4,6-diamidin-2'-fenilindol
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EcR	: Ekdizon Reseptörü
EcR-B1	: Ekdizon Reseptörü B1
EcRes	: Ekdizon Yanıt Elemanları
ER	: Endoplazmik Retikulum
FITC	: Floresan İsoşiyanat
GD	: Gelişim Dönemi
HE	: Hematoksilen ve Eozin boyama
ICAD	: Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz İnhibitörü
JH	: Juvenil Hormon
JHA	: Juvenil Hormon Analogu
K	: Kas Doku
L	: Lipit
Lp	: Lipofuksin
Mt	: Mitokondri
N	: Nükleus
ng	: Nanogram
nM	: Nanomol
PARP	: Polipolimeraz Enzim
PAS	: Periodik Asit Schiff
PB	: Pupal Bağırsak
PF	: Periferel Yağ Doku
PTTH	: Protorasikotropik Hormon
PV	: Periviserel Yağ Doku

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

RXR	: Retinoid X Reseptörü
sa	: Saat
SC	: Sarı Cisim
T	: Trofosit
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-Dutp Nick End Labeling
USP	: Ultraspırakıl Protein
WB	: Western Blotting
µg	: Mikrogram
K0	: Kontrol grubu 0. gün
K1	: Kontrol grubu 1. gün
K2	: Kontrol grubu 2. gün
K3	: Kontrol grubu 3. gün
S1	: Safha 1
S2	: Safha 2
S3	: Safha 3
S4	: Safha 4
S5	: Safha 5
P0	: Pupal Safha 0. gün
P1	: Pupal Safha 1. gün
P2	: Pupal Safha 2. gün
P3	: Pupal Safha 3. gün
P4	: Pupal Safha 4. gün
P5	: Pupal Safha 5. gün
P6	: Pupal Safha 6. gün
P7	: Pupal Safha 7. gün
D1	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu 7. larval instar 1. gün
D2	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu 7. larval instar 2. gün
D3	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu 7. larval instar 3. gün
D4	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu 7. larval instar 4. gün
G	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8. instara geçiş

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

8-0	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 0. gün
8-1	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 1. gün
8-2	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 2. gün
8-3	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 3. gün
8-4	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 4. gün
8-5	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 5. gün
8-6	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 6. gün
8-7	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 7. gün
8-8	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 8. gün
8-9	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 9. gün
8-10	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 10. gün
8-11	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 11. gün
8-S3	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 3. safha
8-S4	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 4. safha
8-S5	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu, 8.instar 5. safha
8-P0	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu Pupal Safha, 0. gün
8-P1	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu Pupal Safha, 1. gün
8-P2	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu Pupal Safha, 2. gün
8-P3	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu Pupal Safha, 3. gün
8-P4	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu Pupal Safha, 4. gün
8-P5	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu Pupal Safha, 5. gün
8-P6	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu Pupal Safha, 6. gün
8-P7	: 5 µg Fenoksikarb Uygumala Grubu Pupal Safha, 7. gün
▶	: Nükleus
▷	: Sitoplazmik İnküzyon
→	: Önosit Hücresi
*	: Otofagozom
★	: Otolizozom
►	: Sitoplazmik Uzantı
▷	: Lizozom
+	: Fagofor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3-1.	Güvelenmiş bal petekleri	24
Şekil 3-2.	<i>Galleria mellonella</i> yumurtaları	25
Şekil 3-3.	Erken gelişim evrelerinde <i>Galleria mellonella</i> larvaları	26
Şekil 3-4.	Yeni deri değiştiren <i>Galleria mellonella</i> larvaları	27
Şekil 3-5.	a) 7. instar <i>Galleria mellonella</i> larvaları gezinme ve örme davranışı, b) 5 µg fenoksikarb uygulamasının ardından beslenen 8. instar larvaları.	27
Şekil 3-6.	<i>Galleria mellonella</i> larvası baş kapsülünde bulunan stemmata	28
Şekil 3-7.	Larvalarda pigmentlerin stematadan göçü temel alınarak geliştirilen sınıflandırma şeması	28
Şekil 4-1.	<i>Galleria mellonella</i> pupaları	47
Şekil 4-2.	Kontrol grubu larvası 7. instar 0. gün ve fenoksikarb uygulamasının ardından görülen ekstra larval safhalarda (8. ve 9. instar) 0. gün larvaları.	47
Şekil 4-3.	Deri değişimini parça parça atarak gerçekleştiren 9. instar larvası	48
Şekil 4-4.	7., 8., ve 9. instar 0. gün baş kapsülü	48
Şekil 4-5.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu larva ve pupalarına ait ağırlık değişimi.	50
Şekil 4-6.	Larval evrede önositler	52
Şekil 4-7.	Pupanın abdominal bölgesi enine kesiti, HE boyama.	53
Şekil 4-8.	<i>Galleria mellonella</i> larvası trofosit hücrelerinde ince yapı	56
Şekil 4-9.	<i>Galleria mellonella</i> larvası trofosit hücreleri	57
Şekil 4-10.	Larval evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) K0, b) K2, c) K1, d) D1, e) K1 (TEM), f) D1 (TEM), g) K2, h) D2	58
Şekil 4-11.	Larval evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) K3, b) D3, c) S1, d) D4, e) S2, f) G (TEM)	59
Şekil 4-12.	Larval evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) S3, b) 8-S3, c) S3 (TEM), d) 8-S3 (TEM), e) S4, f) 8-S4, g) S5, h) 8-S5	60
Şekil 4-13.	Ekstra larval evre (8. instar) trofositlerinin histolojik (HE) görüntüleri; a) 8-0, b) 8-1, c) 8-2, d) 8-3, e) 8-4, f) 8-5, g) 8-6, h) 8-7.	61
Şekil 4-14.	Ekstra larval evre (8. instar) trofositlerinin histolojik (HE) görüntüleri; a) 8-8, b) 8-9, c) 8-10, d) 8-11.	62
Şekil 4-15.	Pupal evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) P0, b) 8-P0, c) P0 (TEM), d) 8-P0 (TEM), e) P1, d) 8-P1, e) P2, f) 8-P2.	63
Şekil 4-16.	Pupal evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) P3, b) 8-P3, c) P3 (TEM), d) 8-P3 (TEM), e) P4, f) 8-P4, g) P5, h) 8-P5	64
Şekil 4-17.	Kontrol grubuna ait pupal evrenin 3. günü (P3) trofositlerin ince yapısı	65
Şekil 4-18.	5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait pupal evrenin 3. günü (8-P3) trofositlerin ince yapısı	65
Şekil 4-19.	Pupal evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) P6, b) 8-P6, c) P6 (TEM), d) 8-P6 (TEM), e) P7, f) 8-P7.	66

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sayfa No

Şekil 4-20.	Kontrol grubuna ait pupal evrenin 6. günü (P6) trofositlerin ince yapısı.....	67
Şekil 4-21.	5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait pupal evrenin 6. günü (8-P6) trofositlerin ince yapısı.....	67
Şekil 4-22.	Larval evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri.....	70
Şekil 4-23.	Larval evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri; a) S1, b) D4, c) S2, d) G, e) S3, f) 8-S3, g) S4, h) 8-S4.....	71
Şekil 4-24.	Larval ve pupal evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri.....	72
Şekil 4-25.	Pupal evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri.....	73
Şekil 4-26.	Pupal evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri; a) P7, b) 8-P7.....	74
Şekil 4-27.	Ekstra larval evre (8. instar) trofositlerinin histolojik (PAS) görüntüleri.....	75
Şekil 4-28.	Ekstra larval evre (8. instar) trofositlerinin histolojik (PAS) görüntüleri; a) 8-8, b) 8-9, c) 8-10. d) 8-11.	76
Şekil 4-29.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarında trofosit hücre boyutlarının ortalamaları.....	78
Şekil 4-30.	Kontrol grubuna ait larval ve pupal evre trofositlerinde apoptotik hücreler (TUNEL).....	81
Şekil 4-31.	5µg fenoksikarb uygulama grubuna ait larval ve pupal evre trofositlerinde apoptotik hücreler (TUNEL).....	82
Şekil 4-32.	5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait pupanın 6. günü (8-P6) trofositlerinde apoptotik hücreler.....	83
Şekil 4-33.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grupları spesifik kaspaz 3 enzim aktivitesi.....	84
Şekil 4-34.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu total protein miktarı.....	86
Şekil 4-35.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubuna spesifik asit fosfataz enzim aktivitesi.....	88
Şekil 4-36.	Kontrol grubu larval döneme ait EcR-B1 proteini (WB).....	90
Şekil 4-37.	Kontrol grubunda pupal döneme ait EcR-B1 proteini (WB).....	90
Şekil 4-38.	Kontrol grubu larva ve pupalarına ait EcR-B1 western blot analizleri band nispi yoğunlukları.	90
Şekil 4-39.	5 µg fenoksikarb uygulama grubu 7. instar larvalarına ait EcR-B1 proteinin belirlenmesi (WB).....	91
Şekil 4-40.	5 µg fenoksikarb uygulama grubu 8. instara ait EcR-B1 proteinin belirlenmesi (WB).....	91
Şekil 4-41.	5 µg fenoksikarb uygulama grubu pupalarına ait EcR-B1 proteinin belirlenmesi (WB).....	91
Şekil 4-42.	5 µg fenoksikarb uygulama grubu larva ve pupalarına ait EcR-B1 western blot analizleri band nispi yoğunlukları.....	92
Şekil 4-43.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda eşdeğer gelişim dönemlerine ait karşılaştırmalı EcR-B1 western band nispi yoğunlukları.....	92

TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 3-1.	Fenoksikarb uygulama planı.....	29
Tablo 4-1.	Fenoksikarbın larvaların gelişimleri üzerine etkisi.....	46
Tablo 4-2.	Kontrol ve fenoksikarb uygulama grupları baş kapsülü ölçümlerine ait p değerlerini gösteren tablo.....	49
Tablo 4-3.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarının ağırlık değişimlerine ait p değer çizelgesi.....	51
Tablo 4-4.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu trofosit boyutlarına ilişkin Mann-Whihtney U testi değeri değerleri	78
Tablo 4-5.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu spesifik asit fosfataz enzim aktivitesine ilişkin Mann Whitney-U testi p değer tablosu.....	85
Tablo 4-6.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu total protein miktarına ilişkin Mann Whitney-U testi p değer çizelgesi.....	86
Tablo 4-7.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu spesifik asit fosfataz enzim aktivitesine ilişkin T Testi p değer tablosu.. ..	88
Tablo 4-8.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarında gelişim dönemlerinin karşılaştırmalı spesifik asit fosfataz enzim aktivitesine ilişkin T Testi p değer tablosu.....	89
Tablo 4-9.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait EcR-B1 proteinin nispi yoğunluğunun Mann Whitney testi p değeri çizelgesi. 93	
Tablo 4-10.	Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda eşdeğer gelişim dönemlerine ait karşılaştırmalı EcR-B1 proteinin nispi yoğunluğunun Mann Whitney testi p değeri çizelgesi.....	94

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tecrübesi ile lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan, danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Kamil KOÇ ve Doç.Dr. Ebru GÖNCÜ'ye sonsuz teşekkürler ederim. Ayrıca, değerli fikirleriyle her zaman yol gösteren Tez İzleme Komitesi hocalarım Prof. Dr. Hüseyin ARIKAN ve Prof. Dr. Erdal BALCAN'a, çalıştığım materyal ile ilgili tecrübelerini esirgemeyen beni içtenlikle aydınlatan Doç. Dr. Olga SAK'a, histolojik materyallerin fotoğraflandırılmasındaki yardımları için Doç. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN'e, elektron mikroskobu çalışmalarımda zamanını ve yardımını esirgemeyen Uzm. Biyolog Özcan ÜSTÜN'e, dostluklarını ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Dr. Ramazan URANLI, Dr. İlknur DÜLGER, Dr. Sevilay ÖZTÜRK, Uzm. Biyolog Dilek ŞEKER ve Yüksek Lisans öğrencileri Büşra GÜNAY ve Tuğçe ERGİN'e sonsuz teşekkürler ederim.

Bu çalışmayı, 2014-013 numaralı proje ile destekleyen Manisa Celal Bayar Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne ve 216Z019 numaralı proje ile destekleyen TÜBİTAK'a şükranlarımı sunarım.

Son olarak, tüm hayatım boyunca olduğu gibi lisansüstü eğitimim süresince de maddi ve manevi olarak hep yanımda olan, varlıklarıyla moral ve güç veren annem Nigâr POYRAZ'a, babam Ethem POYRAZ'a, kardeşim Zaim Osman POYRAZ'a, her zaman desteğini hissettiğim sevgili eşim Mustafa TINARTAŞ'a ve tez çalışmalarımın birlikte büyüyen, hayatımı güzelleştiren, biricik kızım Ceren TINARTAŞ'a yürekten teşekkürü bir borç bilirim.

Esen POYRAZ TINARTAŞ
Manisa, 2018

ÖZET

Doktora Tezi

Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae) Yağ Dokusunda Programlanmış Hücre Ölümüne Juvenil Hormon Analogu Fenoksikarb'ın Etkisinin Araştırılması

Esen POYRAZ TINARTAS

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zooloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamil KOÇ

II. Danışman: Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ

Böceklerde yağ doku; protein, karbonhidrat ve lipidlerin sentezlendiği, depolandığı, metabolize edildiği, detoksifikasyon süreçlerinin gerçekleştiği özel bir dokudur. Omurgalılarda bulunan karaciğer ve yağ dokusunun görevlerini tek başına üstlenen yağ dokunun fonksiyonları endokrin sistem tarafından düzenlenir. Metamorfoz sırasında büyük bir değişim süreci içine girer ve “yeniden şekillenme” geçirir. Larval yağ doku hücreleri programlanmış hücre ölümüyle uzaklaştırılırken, ergin yaşamına uyum sağlayacak yeni yağ hücreleri kök hücrelerden çoğalır ve gelişir.

Bu çalışmada, öncelikli olarak, *Galleria mellonella* yağ dokusunda larval-pupal metamorfoz sırasında meydana gelen yeniden şekillenme sürecinde gerçekleşen programlanmış hücre ölümünün temel özellikleri analiz edilmiştir. İkinci olarak yağ dokunun yeniden şekillenme sürecinde, juvenil hormonun üstlendiği rol, bir juvenil hormon analogu olan fenoksikarb uygulaması yapılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Larval yağ doku hücrelerinin dejenerasyonu sürecinde apoptozisin spesifik belirteçleri morfolojik gözlemler, TUNEL metodu ve spektrofotometrik olarak kaspaz 3 enzim aktivitesinin ölçümü ile araştırılmıştır. Otofaji sürecinin analizi için ise transmisyon elektron mikroskobu incelemeleri ve spektrofotometrik olarak asit fosfataz aktivitesinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Yağ dokuda yeniden şekillenme süreci ile steroid hormon ekdizon arasındaki bağlantının analizi için ise ekdizonun reseptör formlarından EcR B1 proteini western blot ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar larval yağ doku hücrelerinin dejenerasyon sürecinin büyük ölçüde otofajik hücre ölümü ile gerçekleştiğine işaret etmektedir. Fenoksikarb uygulaması, son instar larvalarının ekstra larval deri değişimi geçirmelerine neden olmuştur. 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda, larval yağ doku hücrelerinin programlanmış hücre ölümü ile ortadan kaldırılmasının engellendiği, dolayısıyla yağ dokuda yeniden şekillenme sürecinin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bu sonuç juvenil hormonun yağ doku yeniden şekillenme sürecindeki inhibe edici etkisini ortaya koymuştur. Kontrol grubu ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu larva ve pupalarında metamorfoz süresince, western blot ile elde edilen sonuçlar ekdizonun EcR-B1 izoformu aracılığı ile larval

yağ doku hücrelerinde gerçekleşen otofajik hücre ölümünde rol oynadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: (apoptoz, EcR-B1, fenoksikarb, *Galleria mellonella*, juvenil hormon, otofaji, yağ doku)

2018, XIII+154 sayfa



ABSTRACT

PhD Thesis

Investigation of Juvenile Hormone Analogue, Fenoxycarb, Effect on Programmed Cell Death of Fat Body in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)

Esen POYRAZ TINARTAS

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Zoology**

Supervisor: Prof. Dr. Kamil KOÇ

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru GÖNCÜ

Insect fat body is a special tissue that proteins, carbohydrates and lipids are synthesized, stored, metabolized, detoxification processes are carried out. Functions of the fat body that undertakes the tasks of the liver and fat tissue in the vertebra alone, are regulated by the endocrine system. During metamorphosis, it enters a major change process and “remodeling”. While larval fat body cells are being removed by programmed cell death, new fat body cells that adapt to adult life multiply and develop from stem cells.

In this study, primarily, key features of programmed cell death during the remodeling process during the larval-pupal metamorphosis of *Galleria mellonella* fat body were analyzed. Secondly, during the fat body remodeling process, the role of juvenile hormone was tried to be elucidated by applying a juvenile hormone analogue, fenoxycarb.

Specific markers of apoptosis during degeneration of larval fat body cells were investigated by morphological observations, TUNEL method and measurement of caspase 3 enzyme activity spectrophotometrically. Transmission electron microscopy studies and spectrophotometric measurement of acid phosphatase activity were performed for the analysis of autophagic cell death. EcR B1 protein, an ecdysone receptor isoform, was determined by western blot for analysis of the link between fat body tissue remodeling process and steroid hormone ecdysone. The results indicate that the degeneration process of larval fat body cells is largely accomplished by autophagic cell death. Fenoxycarb application caused extra larval molting in the last instar larvae. It was determined that in the 5 µg fenoxycarb application group, removal of the larval fat body cells by programmed cell death was prevented, and thus the remodeling process in the fat body was not performed. This result revealed the inhibitory effect of juvenile hormone on fat body remodeling. During the metamorphosis of the control group and the 5 µg fenoxycarb-treated group larvae and pupae, the high presence of ecdysone receptor B1 by western blotting demonstrates that it plays a role in the autophagic cell death in larval fat body cells through the EcR-B1 isoform of ecdysone.

Keywords: (apoptosis, autophagy, EcR-B1, fenoxycarb, *Galleria mellonella*, fat body, juvenile hormone,)

2018, XIII+154 pages



1. GİRİŞ

Galleria mellonella (Linneaus, 1758), büyük balmumu güvesi olarak bilinir ve larvası bal petekleriyle beslendiği için arıcılık endüstrisinde ekonomik kayıplara neden olan zararlı bir türdür. Kültürü için özel bir eğitim, ekipman ve hayvan barınağına ihtiyaç olmadığından laboratuvar şartlarında kolay ve ucuz yöntemlerle yetiştirilebilir. Larval döngüsü optimum koşullarda 6-7 hafta olup kültür koşullarında yarı sentetik besinlerle beslenir [1]. Larvalar yedi instardan sonra pupa evresine girerler. *Galleria mellonella* larva ve pupaları böcek fizyolojisi çalışmalarında kullanılan en eski organizmalardan birisidir. Böcek hormonlarının, fizyolojik rolleri ve etki mekanizmalarının araştırılmasına ilişkin yapılmış ilk çalışmalarda deney hayvanı olarak kullanılmıştır [2, 3, 4].

Böceklerin büyüme ve gelişimi endokrin sistemin iki temel hormonu olan ekdisteoridler, özellikle 20-hidroksiekdizon (20HE) ve juvenil hormon (JH) tarafından düzenlenir. Bu hormonların fonksiyonları ve etki mekanizmaları üzerine sayısız çalışma yapılmış, ancak elde edilen sonuçlar ekdisteroidler açısından tatmin edici olsa da juvenil hormon ve etki mekanizmasına ilişkin bilinenler halen daha sınırlıdır.

JH, larval karakterlerin devamlılığı, metamorfozun düzenlenmesi, üreme döneminde feromon üretimi, özellikle Hymenoptera takımındaki böceklerde sosyal sınıfın belirlenmesi, vitellogenезде yumurta depo proteinlerin sentezi ve depolanması gibi birçok fonksiyonu yerine getirmektedir. Kimyasal yapısının stabil olmamasından dolayı, JH'nun etki mekanizmasının belirlenmesine ilişkin çalışmalarda JH analogları kullanılmaktadır. Lepidopterlerde JH analoglarıyla yapılan araştırmalar, son larval evrede yapılan uygulamaların, uygulama zamanı ve uygulama dozuna bağlı olarak larval-pupal metamorfozu geciktirdiğini, tamamen baskıladığını veya larval-pupal araform oluşumlarına neden olduğunu göstermektedir [5, 6].

Holometabol böceklerde larval-pupal metamorfoz, bazı larval dokuların ortadan kaldırılmasını ve ergin dönemde fonksiyonel olacak olan yeni doku ve organların kök hücrelerden oluşturulmasını kapsayan “yeniden şekillenme” süreçlerini içermektedir. Çeşitli makromoleküllerin yıkımına ve farklı makromoleküllerin

sentezine bağılı olarak gerçekleşen bu fizyolojik işlemlerin düzenlenmesi büyük ölçüde ekdisteroidler ve juvenil hormonlar tarafından gerçekleştirilmektedir.

Bceklerdeki yağ doku, omurgalıların karaciğer ve yağ dokusu ile analogdur. Protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmasının gerçekleştiği, hemolenf bileşenlerinin sentezlendiği esas organ olması nedeniyle büyük öneme sahiptir [7]. Holometabol böceklerde larval-pupal metamorfozda gerçekleşen yeniden şekillenme sürecinde larval yağ dokusu hücrelerinin birbirinden ayrılarak hemosölde süspanse hale geçtiği ve dejenerasyona uğradığı bilinmektedir [7, 8, 9]. Yapılan alışmalardan; *Bombyx mori*'de larval-pupal dönüşüm sırasında başlayan aşamalı olarak ilerlediği tespit edilen apoptotik ve otofajik hücre ölümü mekanizmaları ile pupal safhada programlanmış hücre ölümü geçirdiği tespit edilmiştir [9, 10, 11, 12]. *Helicoverpa zea*'da yapılan elektron mikroskobu incelemeleri pupal safhanın ilk günlerinde sitosölde artış gösteren otofajik vakuollere rağmen pupal safha süresince larval yağ dokunun varlığını srdrdği tespit edilmiştir [13]. *Manduca sexta*'da DNA fragmentasyonu olmasına rağmen kaspaz aktivitesinin belirlenemediği, larval-pupal metamorfoz süresince otofajik vakuollerin ve yükselen asit fosfataz aktivitesi ile yağ dokunun yeniden şekillendiği belirlenmiştir [14]. *Drosophila melanogaster*'de yağ dokunun metamorfozun prepupal dönemde başlayan otofaji ile pupal safhada devam ettiği, erginin ilk günlerinde larval yağ doku hücrelerinin varlığını koruduğu tespit edilmiştir [10]. *Drosophila melanogaster*'de yağ dokunun yeniden şekillenmesinde hücre ölümü mekanizmaları ilişkin bilinenler daha detaylı olmasına rağmen, sürecin lepidopterlerde gerçekleşmesine ilişkin veriler sınırlıdır. Lepidoptera ordosuna ait aynı türü çalışan araştırmacılar arasında dahi birbiriyle çelişen sonuçlar dikkat çekmektedir.

20HE'nin orta bağırsak, anterior ipek bezi, tükürük bezi ve yağ dokuda programlanmış hücre ölümünü başlatan esas faktör olduğu birçok araştırmada tespit edilmiştir. Endokrin sistemin etkin bir hormonu olan juvenil hormonun yağ dokunun yeniden şekillenme süreçlerinde üstlendiği rollere ilişkin sınırlı veri bulunmaktadır. Bu nedenle güçlü bir JH analogu olan fenoksikarb topikal olarak larvalara uygulanmıştır.

Çalışmamızda ilk olarak, doğal ortamlarından alınan *Galleria mellonella* larva ve pupaları laboratuvar ortamında kültüre edilmiş ve yumurtlamaları sağlanmıştır.

Yumurtadan itibaren yetiştirilen *Galleria mellonella* larvalarına juvenil hormon analogu fenoksikarb son larval evrelerinin 0. günü sekiz farklı doz uygulanmıştır. Bu dozlar arasından, larvaların çoğunluğunda (%70) aynı etkiyi yaratan ve istikrarlı sonuç alınan 5 µg dozun uygulama dozu olduğuna karar verilerek ileri aşama çalışmalara geçilmiştir.

İkinci olarak 5µg fenoksikarb uygulanan larvalar ile deney grubu oluşturularak, fenoksikarbın yağ dokuda meydana gelen yeniden şekillenme süreçlerine olan etkisi araştırılmıştır. Meydana gelen farklılıklar kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak ele alınmış ve etki mekanizması zaten aydınlatılamamış olan ve araştırmacılar tarafından ilgi çeken juvenil hormonun yağ dokuda meydana getirdiği etkilerinin anlaşılmasına yönelik önemli bilgiler elde edilmiştir.

Çalışmamızda, *Galleria mellonella* yağ dokusunda larval-pupal dönüşüm süresince meydana gelen yeniden şekillenme sürecinde gerçekleşen programlanmış hücre ölümünün temel özellikleri ve yağ dokunun yeniden şekillenme sürecinde, juvenil hormonun üstlendiği rol, bir juvenil hormon analogu olan fenoksikarb uygulaması yapılarak aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Galleria mellonella* 'nın Biyolojisi

Büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* (Linneaus, 1758) bal arısı (*Apis mellifera* Linneaus, 1758) kolonilerinde yaygın olarak bulunur ve tüm dünyada yayılış gösteren zararlı bir lepidopter türüdür. Larvalar, arıları strese sokarak bal üretimini azaltmakta ve bal petekleriyle beslenerek arılarda enerji kaybına yol açmaktadır. Ayrıca, koza örme sürecinde kovanları ve petek çerçevelerini çiğneyerek materyallerde kalıcı hasarlara, dolayısıyla ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Balmumu güvelerinin ekonomik zararları, bu canlıların yaşam döngüleri, biyolojileri, davranışları, ekolojik özellikleri, moleküler biyoloji ve fizyoloji çalışmaları ile kontrolleri üzerinde çok sayıda çalışma yapılmasına yol açmıştır. Arıcılık endüstrisindeki yeri ve önemine rağmen, özellikle böcek fizyolojisi, genomik ve proteomik araştırma alanlarında model organizma olarak dikkat çeken bir türdür [1]. Nörosekresyon ve beyin fonksiyonları, corpora allata ve juvenil hormon fonksiyonları, protorasik bez ve ekdizon fonksiyonları çalışılan konular arasında yer alır [15]. *Galleria mellonella*'da juvenil hormon ve ekdisteroidlerin değişimlerine ilişkin yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur [16-20].

Büyük balmumu güvesinin sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir.

Regnum	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Subphylum	: Hexapoda
Classis	: Insecta
Subclassis	: Pterygota
Superordo	: Holometabola
Ordo	: Lepidoptera
Superfamilia	: Pyraloidea
Familia	: Pyralidae
Subfamily	: Gallerinae
Genus	: <i>Galleria</i>
Species	: <i>Galleria mellonella</i>

Galleria mellonella tam başkalaşım geçiren bir böcek türüdür. Post embriyonik dönemde larva, pupa ve ergin olmak üzere üç ayrı gelişim dönemi vardır [21]. Yumurtaları beyaz ile sarımsı bir renk arasındadır. Ergin dişiler 50-150 yumurta bırakırlar. Yumurtalar 29-35°C arasındaki sıcaklıklarda hızlıca gelişim gösterirken 18°C’de 30 gün ve daha uzun sürede yumurtadan çıkar [1]. Yumurtadan çıkan larvalar beyazımsı renkte olup 1-3 mm boyundadırlar. Hemen beslenmeye ve ağ salgılamaya başlarlar. Baş kapsülleri sarımsı olup belirgindir. Larvalar gelişimleri süresince 7 kez deri değiştirirler ve pupal döneme geçerler. Yaşam döngüleri sıcaklıktan etkilenir ve yaşam süreleri sıcaklığa göre değişim gösterir [22]. Doğal ortamlarında larvalar karanlıkta, ılık ortamda ve zayıf havalandırma koşullarına sahip arı kovanlarında iyi gelişim gösterirler. 29-32°C sıcaklık, yüksek nemlilik ve sürekli karanlık koşulların gelişimleri için ideal olduğu ileri sürülmektedir [1]. İdeal koşullarında yeterli besin varlığında larval gelişim 6-7 haftada tamamlanır. Daha soğuk koşullarda ise 5 aya kadar çıkabilir [22]. Koza içerisinde larvadan pupaya geçiş zamanı sıcaklığa bağlı olarak 3 ile 6 gün arasında değişim gösterir. Pupal gelişim safhası sıcaklığa bağlı olarak 6 ile 55 gün arasında değişim gösterir. Pupa ve ergin bireyler beslenmez. Erginler nokturnal böceklerden olup geceleri aktiftir ve gün boyu karanlıkta gizlenirler [1].

Ergin dişiler yumurtlamak için çatlak veya yarık yüzeyleri tercih eder. Uygun bir yer bulduğunda, mümkün olduğu kadar derine ovipositorünü uzatarak yumurta bırakmaya çalışır. Laboratuvar çalışmalarında dişiler 3-13 gün süresince yumurta bırakmaya devam etmektedir [1]. Ergin dişiler yaşamları süresince ortalaması ise 700 yumurta bırakır [22, 23].

2.2. Programlanmış Hücre Ölümü

Programlanmış hücre ölümü fizyolojik ve evrimsel olarak korunmuş bir süreç olup çok hücreli organizmalarda embriyonik gelişim, doku sağlığı ve patojenlere karşı savunma gibi yaşamsal olaylarda rol alır. Programlanmış hücre ölümü ilk olarak amfibi metamozunda gözlemlenmiştir [24]. Kerr et., al [25] yayınladıkları çalışmada ise ilk kez genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümünü “Apoptozis” terimini kullanmışlardır. Takip eden 30 yılda apoptozis terimi programlı hücre ölümünü tanımlamak için genel bir terim olarak kullanılmış ve moleküler

mekanizmasının aydınlatılması hakkında çalışmalar yapılmıştır. Apoptotik olmayan alternatif hücre ölüm mekanizmalarının varlığı, artan moleküler biyoloji bilgi birikimi ve apoptoz araştırmalarının artık bir doygunluğa ulaşması nedeniyle son yıllarda ilgi odağı olmuştur.

Programlanmış hücre ölümü iki alt kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; apoptoz (Tip I), otofajidir (Tip II) [26].

2.2.1. Apoptoz

Apoptoz (Apoptozis) hücre intiharı olarak da bilinen, genetik kontrol altında gerçekleşen fizyolojik bir olaydır. Yunancada apo (ayrı) ve ptosis (düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuş, sonbaharda yaprakların dökülmesine atfen ayrılıp, düşmek anlamına gelen bir kelimedir [25]. Doku yaşamı, hücreyel çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümü arasındaki güçlü bağlantıyla sürdürülür. Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir [27].

Apoptozis normal gelişimsel süreç içerisinde doku organ ve bezlerin embriyonik gelişimlerinde, sinir sisteminin gelişiminde, bağırsak kripta epitelleri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesinde, normal menstruel döngüde endometrial hücrelerin yıkımında, immün sistem hücrelerinin üretildiği olgunlaşma ve aktifleşme süreçlerini geçiren organlarda, virüsle enfekte olan organizmalarda hasar görmüş tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde ve hormona bağımlı olarak dokuların yeniden şekillenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte görev alır. Organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hücre içi haberci sinyalleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır [27, 28].

Homeostatik dengenin bozulması organizmada birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol almaktadır. Apoptotik hücre ölümü düzenlenmesinde meydana gelen aksaklıklar, hatalı hücre birikiminin olduğu kanser gibi hastalıklara yol açabildiği gibi sağlıklı hücre yıkımının arttığı otoimmün rahatsızlıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve alzheimer gibi rahatsızlıklara da yol açtığı bilinmektedir [29].

Apoptotik hücre ölümü, hücrenin içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılır. Birbirini takip eden olaylar zinciri ile seyreden süreç hücrenin fagositozu ile sona erer.

2.2.1.1. Apoptozisin Başlatılması

Apoptozis mekanizması iki ana yol üzerinden başlatılmaktadır. İlk yol, hücre yüzeyindeki “ölüm reseptörleri”nin aktivasyonu ile başlayan hücre dışı yoldur. Hücre dışı yoldan apoptozisin başlatılmasında hücre yüzey reseptörleri rol alır. Diğer ise stresle tetiklenen ve mitokondrideki değişikliklerle devam eden hücre içi yoldur. Bazı durumlarda apoptozis hücre içi stresin sonucunda üretilen hücre içi bir etkiyle başlatılmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} düzeyi artışı veya pH azalışı gibi hücre içi stres, oksidatif stres, radyasyon, viral enfeksiyonlar, büyüme faktörünün eksikliği, çeşitli kimyasallar, hücre siklusu bozuklukları gibi etkenler hücre ölümünü başlatabilir [28, 30].

İç ve dış sinyaller ile hücre içerisinde endojen inaktif halde bulunan bir grup proteaz (zimogen) aktive olur. Bu proteazlara “kaspaz” (Cystein-containing ASPartate ProteASEs, Caspase) denir. Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre başlatıcı, yürütücü ve sonlandırıcı olarak gruplandırılırlar [31].

2.2.1.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

Apoptozis başlatıcı kaspazlar hücre içi yolda kaspaz-9, hücre dışı yolda kaspaz-8 ve kaspaz-10'dur. Yürütücü kaspazlar ise kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7 olarak gruplandırılabilir [31]. Hücre içi ve dışı yollara dahil olmalarıyla birlikte her iki yolak kesişir [32].

Kaspazlar aktif bölgelerinde sistein içeren aspartata spesifik proteazlardır. Apoptozisin önemli birer aracı olup hücre yaşamı için değerli proteinlerin bu proteazlar tarafından kesilmesi hücrede gözlemlenen birçok morfolojik değişiminin temel nedenidir. Kaspazlar proenzimler olarak üretilirler. NH_2 terminal kısım, büyük (~20 kDa; p20) ve küçük alt birim (~10 kDa; p10) kısımlarından meydana gelir. N-terminal'de pro-domain bölgesi bulunur.

Prokaspazların aktivasyonu için özel bir şekilde kesilmeleri gerekmektedir. Enzimlerin aktif hale gelmeleri yine başka bir kaspazın ilgili prokaspazı aspartik asitin bulunduğu özel bölgeden kesmesi ve prodomain bölgesini koparması ile gerçekleşir. Aktifleşen bu kaspazlar başka prokaspazları keserek aktive ederler. Hücre ölümünde görülen bu özel mekanizmaya “Kaspaz reaksiyon zinciri” adı verilmiştir [31].

2.2.1.2.1. Kaspaz-3’ ün Apoptozisdeki Yeri ve Önemi

Apoptozisin en önemli fazı kaspaz-3 aktivasyonudur. Hem iç hem de dış yolak aracılığı ile aktifleşebilen kaspaz-3 yürütücü kaspazlardan bir tanesidir. CPP32, Yama veya apopain olarak isimlendirilir. 32 kDa sistein proteazı olarak insanda kodlandığı bulunmuştur. Kütle spektroskopisi analizi (MS analizi) ve N-terminal sekansı analizlerine göre, aktif enzim öncü proteinin Asp-28-Ser-29 ve Asp-175-Ser-176’dan kesilmesi sonucu 17 kDa ve 12 kDa’lık iki alt birimden oluşmaktadır [33]. Aktif formuna iki küçük ve iki büyük alt birimden oluşan heterotetramer yapısı ile kavuşur. Aktive olduktan sonra, hücre membranının tomurcuklanması, nükleer kondensasyon ve DNA fragmentasyonu gibi apoptotik değişimlerde merkezi rol oynamaktadır. Kaspaz reaksiyon zincirinde, kaspaz 6 ve kaspaz 7’yi aktive etmektedir.

DNA’da hasar tamirinde rol oynayan Poly (ADP-riboz) polimeraz enzimi (PARP) kaspazların tanımlanan ilk substratıdır. DNA hasarları sırasında kırık DNA zincirlerine bağlanarak poly (ADP-riboz) sentezini katalizler. Kaspaz 3 apoptozis sırasında PARP’a bağlanarak hasarlı DNA’nın onarılmasını önler [34]. Bunun yanı sıra; ICAD (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü) proteininin yıkılmasını katalize ederek DNA fragmentasyonunda aktif rol alır. Sitoiskeletin düzenlenmesinde rol oynayan gelsolin ve fodrin gibi proteinlerin de proteolitik yıkımından sorumludur.

Kaspaz 3, PARP’ta orijinal olarak tanımlanana benzer ortak bir Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) motifi içeren çok sayıda substratın proteolitik olarak yıkımını gerçekleştirir. PARP’ın bilinen kesilme bölgesi (DEVD|G)’ne dayanarak Ac-DEVD-AMC model substrat olarak sentezlenip ticari olarak bulunurken; Ac-DEVD-CHO ve biyotinlenmiş türevleri PARP kesilme bölgesine spesifik inhibitörler olarak sentezlenmektedir [33].

2.2.1.3. Hücre İçi Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler

Apoptotik hücre ölümüne giren hücrelerde morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlenir.

2.2.1.3.1. Morfolojik Değişiklikler

Apoptozisin erken evrelerinde hücrelerarası bağlantılarda zayıflama ve yüzey farklılaşmalarında kayıplar gerçekleşir. Plazma membranında bulunan Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasında sıvı dengesi bozulur. Belirgin bir şekilde büzülen hücre, hacminin üçte birini kaybeder ve çevre ile olan bağlantılarını keser [27, 30].

Apoptoziste ana morfolojik değişim nükleusta görülür. Aktifleşen sonlandırıcı kaspazlar (3, 6, 7) nükleer laminanın bozulmasına neden olurlar. Kaspazlar nükleer por komplekslerini ve nükleer kanalları da yıkarak nükleus membranı geçirgenliğini değiştirirler. Laminler, lamin ilişkili polipeptitler ve nükleoporinlerin dahil olduğu nükleus membran proteinleri kromatin ile temas halinde olduğundan dolayı, bu proteinlerin yıkımı kromatin konformasyonunu da değiştirir. Nükleusta membran periferinde DNA yoğunlaşması görülür. Bunun yanı sıra kaspazlar, nükleusta aktin-miyozin iskeletini de yıkarak nükleus membranında çöküntülere neden olur. Aktif hale geçen kaspazlar, spesifik DNaz'ları (CAD) aktive ederek DNA'nın fragmentlere ayrılmasına neden olur ve apoptotik hücrede tipik olarak rastlanılan morfolojiyi oluşturur [35].

Apoptozisin ilerleyen evrelerinde nükleusta yoğunlaşan kromatin parçalanır. Daha sonra, sitoplazmayı ve içerisindeki kromatin fragmentleri ve diğer parçalanmış yapıları çevreleyen membran tomurcuklanmaları oluşur ve ardından bu tomurcuklar hücreden ayrılır. Zar ile çevrelenerek hücreden ayrılan bu yapılar "Apoptotik cisim" olarak adlandırılır. Bu aşamada hücre hala yaşamaya devam etmektedir [27, 30, 36]. Apoptotik cisimler fagositlerin lizozomları veya heterofagositoz sonrası komşu hücrelerin lizozomlarında sindirilir.

2.2.1.3.2. Biyokimyasal Değişiklikler

Apoptotik hücre ölümünde gerçekleşen en belirgin değişim, DNA'nın endonükleaz enzim aktivitesiyle nükleozomal birimlere ayrılmasıdır. Normal

hücrelerde inhibitör molekülü ICAD (Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü) ile inaktif formda bulunan CAD (Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) enziminin aktive olmasıyla DNA nükleozom birimlerine ayrılır. CAD'ı aktive eden temel faktör apoptoz sinyali alan hücrede kaspaz 3'ün aktifleşmesi ve ICAD'ı kesmesidir. CAD enzimi bir DNaz'dır. Endonükleazlar polinükleotit zincirindeki fosfodiester bağını kesen enzimlerdir. CAD, DNA'nın nükleozom birimlerine ayrılmasını sağlar. Nükleus DNA'sı hızlı biçimde 180-200 baz çiftlik nükleozomal fragmentlere ayrılır [28, 37].

Apoptozisin bir diğer önemli biyokimyasal değişimi hücre membranında görülen değişikliklerdir. Normalde hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfatidil serin molekülleri, aminofosfolipit transferaz enzimiyle membranın dış yüzeyine göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozi uyarır [36].

Bir diğer biyokimyasal değişiklik ise hücre iskeletinin ana bileşenlerini yıkan prokaspazların aktif hale gelmesidir. Kaspazların aktive olmasıyla birlikte substratları olan aktin, lamin ve tubilin gibi sitoskelet proteinleri yıkıma uğrar. Hücre normal şeklini kaybeder ve büzülür [38].

2.2.1.4. Fagositoz

Programlanmış hücre ölümü mekanizmasında ölü hücrelerin yangıya neden olmadan ortadan kaldırılması gerekmektedir [39]. Apoptotik hücreler plazma membranında meydana gelen değişiklikler ile komşu hücreler veya doku makrofajları tarafından tanınır ve fagosit edilirler.

2.2.2. Otofaji

Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelmektedir. Ökaryotlarda hücre içi makromoleküllerin ve organellerin membranla çevrilerek bir vakuol içerisine alınmasıyla lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomal enzim aktivitesiyle yıkılma mekanizmasıdır. Hücre içi uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi ile parçalanarak, ortaya çıkan yapı taşları (örn; aminoasitler) hücre kullanımı için yeniden kazandırılır [40].

Otofaji ilk kez 1957 yılında fare böbreğinde yapılan çalışmalarda farkedilmiş ve vakuol yapıları “elektronca yoğun yapılar” olarak adlandırılmıştır. İlerleyen çalışmalarda tanımlanan bu yapıların lizozomal enzimler içerdiği tespit edilmiştir [41]. Böceklerde ise ilk olarak 1965 yılında *Calpodes ethlius*'ta yapılan morfolojik incelemeler ile keşfedilmiştir [41, 42].

Otofaji, mayalardan memelilere kadar evrimsel süreçte korunmuştur [43]. Hücrelerin katabolik süreçlerinde işlev gören temel yolaklardan bir tanesidir. Proteinlerin yıkımı, makromoleküllerin hatta bütün bir organelin sindirimini gerçekleştirebilen güçlü bir mekanizmadır. Tüm vücut hücrelerinde bazal seviyede aktif olan otofaji uzun ömürlü proteinlerin ve zarar gören yapıların hücreden uzaklaştırılmasında aktif görev alır [44].

Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, hücrenin hayatta kalması ile ilgili bir savunma mekanizması olduğu ileri sürülmüştür. Otofaji, hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, hücre içi moleküllerin geri dönüşümünün sağlanarak stres ortamına uyum sağlanması, yaşamak için enerji elde edilmesi olarak açıklanan bir mekanizmadır. Son yirmi yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma, programlanmış hücre ölümü ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da görev alan, hayatta kalma ve ölüm arasındaki dinamik dengede etkili rol alan bir mekanizma olduğunu ortaya koymuştur. Otofaji mekanizmasında meydana gelen anormalliklerin, çeşitli kanser, enfeksiyon hastalıkları ile Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açacak seviyede canlı vücudu için önemli bir mekanizma olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [40, 41, 43].

Belirli koşullar altında gerçekleşen otofajinin, hücreyi apoptotik hücre ölümünden koruyarak hücrenin sağkalım mücadelesine yardımcı olurken, geniş çaplı ve kuvvetli gerçekleşen otofajinin hücreyi ölüme götürdüğü tespit edilmiştir [41].

Otofaji mekanizması; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç temel mekanizma üzerinden gerçekleşir. Her üç mekanizmanın da ortak özelliği lizozomal yıkım görülmesidir. Mekanizmalar arasındaki fark, sürecin işleyişinin mekanik olarak birbirinden bazı yönleriyle farklı olmasından ileri gelir [43].

Mikrotofaji, lizozom membranının içe çökmesi ile sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan bünyesine alınması ve içeriğinin sindirilmesi mekanizmasıdır [40, 43]. Şaperon aracılı otofajide ise KFERQ motifli proteinlerin lizozom zarına seçici olarak taşınması gerçekleşir [40].

Makrotofaji, otofaji kavramının karşılığı olarak adlandırılan, en çok karşılaşılan ve çalışılan mekanizma tipidir. Çalışmamızda otofaji kavramından bahsedildiğinde kastedilen makrotofaji mekanizmasıdır.

Otofaji aslında tüm ökaryotik hücrelerde gerçekleşen ve hücre tipine göre gerçekleştirilebilme potansiyeli değişen özel bir mekanizmadır. Besin kıtlığında, okside edilebilir substratları ve hücrenin sağkalımı için gerekli olan diğer molekülleri üretmek amacıyla, sitoplazmik yapılar ve makromoleküller spesifik olmayan bir yolla membran çevrilir oysa hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılması ise oldukça seçici ve spesifik bir süreç içerisinde yürütülür. Hücreler otofajiyi hücrenin ölümden kurtulması için iç kaynakların kullanıldığı bir sağkalım mekanizması olarak kullanabilmektedir [44, 45].

Otofajide hücrede meydana gelen en belirgin morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki katmanlı zarla çevrili, sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum gibi organelleri içeren veziküllerin varlığıdır. Makrotofaji sürecinde, ilk olarak “fagofor” olarak adlandırılan genişleyen bir membran kese bütün yapıdaki organeller ve sitosölün bir kısmını sarar. Fagoforlar ilk olarak “otofaji oluşum merkezi” adı verilen ve memelilerde endoplazmik retikulum ile golgi yapılarının arasındaki alanlarda ortaya çıkan yapılardır. Fagoforun uzamasıyla, çift membranla sınırlandırılmış bir çeşit “izolasyon membranı” oluşumu gözlenir. Membranın kaynağı tam belli olmasa da en çok kabul edilen model bunun yeni sentez edilmiş olabileceği görüşüdür. Bu yapının endoplazmik retikulum, mitokondri dışı membranı ya da plazma membranından kaynaklanabileceği ise bir diğer görüştür. Ardından tamamlanmış çift membranlı otofagozom yapısı bir endozom ve/veya lizozom ile birleşerek “otolizozom” yapısını meydana getirilir. Bu son adım, kuşatılan paketin lizozomal hidrolazlara maruz kalarak parçalanmasına olanak sağlar. Sonunda kuşatılan moleküller ile birlikte otofagozomun iç membranı da sindirilir. Oluşan

makromoleküller yeniden kullanım için membran permeazlar yoluyla sitosöle geri taşınır [40, 43, 46].

Otofajik hücre ölümüne olan ilgi son yıllarda maya otofaji genlerinin memeli karşılıklarının bulunması ve çalışmaların morfolojik tanımlardan moleküler düzeye inmeye başlaması sayesinde artmıştır. Otofagozom oluşumu, otofaji-ilişkili genlerin ürünleri olan proteinlere bağlıdır. ATG proteinleri olarak adlandırılan bu proteinler ilk olarak mayalarda keşfedilmiştir. Maya otofaji genlerinin ortologları çok kısa bir süre içinde *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, fare ve insanda da bulunmuştur [44, 47, 48].

Günümüzde model organizma olarak kabul gören ve otofaji çalışmalarının sıklıkla yapıldığı lepidopter bir böcek türü olan *Bombyx mori*'de 14 ATG geni bulunmuştur. Bu genlerin çoğu korunmuş ATG protein domainine sahiptir [41].

Böceklerde deri değiştirme hormonu 20HE sinyali, ekdizonun reseptör proteinini ve heterodimer oluşturduğu protein partneri ile oluşan 20HE-EcR/USP kompleksi aracılığıyla PI3K-Akt-TORC1 yolağını bloke ederken, ATG genlerinin ekspresyonunu düzenler [41].

Yapılan çalışmalar otofajinin açlık durumunda lipid yıkımı ile ilişkili bir mekanizma olduğunu ileri sürmektedir. Otofajinin bloke edilmesiyle hücrede öncelikli olarak lipid birikiminin görüldüğü bildirilmiştir. Bu nedenle otofaji açlık durumunda hücresel enerji homeostasisini sürdürmek için hücre içi lipidlerin kullanımı ile ilgili mekanizma olarak görülmektedir [41].

Lepidopterlerde metamorfoz süresince, tükürük bezi, orta bağırsak ve yağ doku gibi birçok larval dokunun kütleli olarak ortadan kaldırıldığı ya da temelinde otofajik hücre ölümünün yer aldığı yeniden şekillenme süreçleri geçirdikleri bilinmektedir [49, 50].

Apoptotik ve otofajik hücre ölümünü birbirinden ayıran temel farklılıklar vardır. En net ayırım ölmekte olan hücrenin yıkımı için kullanılan mekanizmadır. Apoptotik hücre ölümü sırasında ölen hücre daha önce de bahsedildiği gibi bir

fagositin lizozomu tarafından sindirilir. Buna karşılık, otofajik hücre ölümü geçiren hücreler, sitoplazmik bileşenleri sindirmek için hücrenin kendi lizozomunun birleştiği vakuollerini kullanır. *Drosophila melanogaster* tükürük bezinde olduğu gibi ölen hücre kendi lizozom enzimleriyle kendi sonunu hazırlar. Farklı bir hücre tarafından yutulma ve sindirilmeye uğramaz [51].

Yakın zamana kadar, apoptotik ve otofajik hücre ölümünün farklı moleküler mekanizmalarla kontrol edildiği görüşü yaygındı. *Drosophila melanogaster* tükürük bezi hücre yıkımına ilişkin yapılan çalışmalarda, apoptoz sırasında işlev gören bazı genlerin aynı zamanda otofajik hücre ölümünde de işlev gördüğü tespit edilmiştir. Böceklerde apoptotik hücre ölümünü başlattığı bilinen 20HE'nun aynı zamanda otofajik hücre ölümünü de başlatan esas faktör olduğu, DNA fragmentasyonu gibi apoptozis belirteçlerinin otofajik hücre ölümünde de gerçekleştiği tespit edilmiştir. Tükürük bezi sitoplazmasında yoğunlaşma, hücre membranı tomurcuklanması ve DNA fragmentasyonu apoptotik ve otofajik hücre ölümünde ortak özellikler olarak görülmektedir. Ancak, tükürük bezinde dinamik vakuol değişimleri, hücrelerin ölümünden hemen önce gerçekleşir ve bu değişiklikler apoptotik hücrelerde görülmez [52].

2.3. Yağ Doku ve Programlanmış Hücre Ölümü

Böceklerde yağ doku mezodermal orijinli trofositler ve ektodermal orijinli önositlerden oluşur. Sölm boşluğunda bulunan yağ doku, gelişim safhası ilerledikçe özellikle pupal evrede, hemosölün neredeyse tamamında tüm organları çepeçevre sarar. Tüm metabolik faaliyetlerin gerçekleştirildiği, birçok hemolenf bileşeninin sentezlenerek salındığı temel organ olma özelliğindedir [53]. Böceklerde glikojen, lipit ve proteini sentezleyen, depolayan, metabolize eden temel organdır. Memelilerdeki yağ doku ve karaciğer ile analog olup, karaciğerin fonksiyonlarını tek başına üstlenir. Bunun yanı sıra metamorfoz, uçuş ve üreme süresince lipit, karbonhidrat ve proteinleri metabolize etmede son derece önemli rol oynamaktadır [54].

Holometabol böceklerde embriyonik gelişimin ardından iki deri değişimi arasında geçen her bir larva evresinde, larvanın çeşitli dokularında farklı moleküllerin sentezi gerçekleşmektedir. Bu dokular arasında yağ doku önemli metabolik olayların gerçekleştiği özel bir dokudur. Her larval evrede, larvanın o evre için tüm

faaliyetlerinde gerekli olan ve larvayı bir sonraki deri değişimine hazırlayan birçok sentezin yapıldığı esas dokudur. Genel olarak sentezlenen maddeler ve özellikle proteinler hemolenfe salınarak kullanılırlar ya da depolanırlar. Deri değişimlerinde yağ doku hücreleri bölünür ve büyür [55]. Son larval evrede yağ dokunun metabolik faaliyetleri oldukça karmaşıktır. Çünkü bu evrede yağ dokuda pupa ve ergine geçiş için gerekli değişik biyokimyasal sentezler, beslenmeyen pupa dönemini geçirmek için depo moleküllerin oluşumu, depolanması gerçekleşmekte ve tüm bu faaliyetler diğer larval evrelerden farklı hormonal düzenlemeler ile gerçekleşmektedir. Larval ve pupal yağ doku glikojen, lipit ve karbonhidrat rezervlerini depolarken, ergin yağ doku hücreleri bu rezervleri ihtiyaca göre kullanılacak hale dönüştürür ve dolaşım sistemine salar. Ergin dokuları için gereken enerji ve yapı taşı maddelerinin kaynağı, beslenen larvanın özellikle son larval evrede depoladığı ve pupaya aktardığı bu rezervlerdir. Lepidopter böceklerde tüm bu olaylar larval-pupal metamorfoz sürecinin başlamasıyla gerçekleşir. Dolayısıyla larval yağ doku hücreleri larva-pupa-ergin dönüşümü süresince çok büyük fonksiyonel değişimler yaşar [8]. Yağ dokunun tüm bu metabolik olayları gerçekleştirmesi ve bunlara bağlı olarak gerçekleşen morfolojik değişimler, genetik olarak kontrol edilen gelişimin yeniden programlanması ile hormonal faktörlere verilen farklı yanıtların bir sonucudur.

Holometabol böceklerde metamorfoz süresince yağ dokuda gerçekleşen başlangıç ve işleyiş mekanizmaları tüm türlerde aynı olmamakla birlikte, ergin forma adapte olma yolunda büyük ve böcek yaşamı için çok önemli bir değişim sürecidir. “Yeniden şekillenme” adı altında ifade edilen bu süreçte görevini yitiren larval hücreler ortadan kaldırılırken, yerine yeni yaşam safhasında yeni görevlerini üstlenecek olan hücreler, kök hücrelerden farklılaşarak gelişir, yeni organları ve yapıları oluşturur. Programlanmış hücre ölümü, işlevini yitiren larval yağ doku hücrelerinin ortadan kaldırılmasında görevlidir. Apoptotik ve otofajik karakterdeki iki temel mekanizma ile yeniden yapılanma işlemlerini gerçekleştirir [7, 56].

Bu süreçte, yağ doku loblarını oluşturan ve hücre kümelerini kuşatan bazal membran yıkıma uğrar ve hücreler hemosölde serbest kalır. Lepidopterlerde hemosölde serbest kalan bu hücreler tekrar organize olarak trakeoller tarafından kuşatılır ve ergin vücut yapısının bir parçası haline gelir [7].

Metamorfozda farklı doku ve organlarda yeniden yapılanmada apoptotik ve/veya otofajik hücre ölümü özellikleri birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır [12, 57-62]. Literatür araştırmalarında özellikle holometabol böceklerde, yağ dokusunda yapılan programlanmış hücre ölümü çalışmalarının *Bombyx mori* ve özellikle *Drosophila melanogaster* üzerinde yoğunlaşmış olduğu görülmektedir [7, 11, 12, 61, 63]. Tüm bu araştırmacıların çalışmalarından yeniden şekillenmenin türler arasında farklı zamanlamalarda ve farklı mekanizmalarla gerçekleştiği, bundan dolayı genelleme yapmanın yanlış olduğu anlaşılmaktadır.

2.4. Böcek Hormonları

Böceklerin post embriyonik gelişimi bir seri larval deri değişimi tarafından kesintilere uğratılan gelişim dönemi olarak karakterize edilir. Son larval evrede, kritik ağırlığa ulaşma sonrasında larval-pupal deri değişimi gerçekleşir ve pupal evre başlar. Pupal evrenin sonunda meydana gelen pupal-ergin deri değişimi sonrasında ise üreyebilen ve türe bağlı olarak uçuş yeteneğine sahip ergine dönüşür. Gelişim safhaları içinde gerçekleşen tüm değişimler endokrin sistemin kontrolü altında ekdizon ve JH'nin karşılıklı etkileşime girmesiyle gerçekleşir [5, 64, 65].

Galleria mellonella larva ve pupalarında ilk ekdisteroid seviyesi belirleme çalışması Hsiao and Hsiao [66] (1977) tarafından gerçekleştirilmiş ardından Bollenbacher et al., [16], Maroy and Tarnoy [17], Hwang-Hsuet al., [67] ve Sehnal et al., [68] aynı konuda araştırmalar yapmışlardır. Hemolenfteki 20HE ve JH seviyelerine ilişkin ilk detaylı çalışma Plantevin et al., [18] tarafından gerçekleştirilmiştir.

2.4.1. Ekdisteroidler

Ekdisteroidler, “deri değiştirme hormonu” veya “metamorfoz hormonu” olarak da adlandırılır. Büyük kimyasal çeşitliliği -OH gruplarının pozisyonu ve sayısındaki varyasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ekdisteroidler arasında en fazla çeşitlilik Orthoptera ve Lepidoptera ordolarına ait yumurta ve embriyolarda bulunmuştur [69]. Ekdizon hormonu ilk olarak Butenandt and Karlson [70] tarafından *Bombyx mori* pupalarında α -ekdizon ve β -ekdizon olmak üzere iki farklı steroid molekülü formu olarak izole edilmiştir. α -ekdizon genel olarak “ekdizon” ismiyle bilinir. Protorasik bez tarafından salgılanan inaktif prohormondur. Yağ doku ve epidermal dokularda

“20-hidroksiekdizon” adı verilen aktif forma dönüştürülür. 20HE ise β -ekdizon veya “ekdisteron” olarak adlandırılan hormondur. Deri değiştirme hormonunun aktif formu olarak kabul edilir [5].

Ekdizon böcek gelişimini düzenleyen en önemli hormonlardandır [17]. Böceklerin postembriyonik yaşamları süresince larval-larval, larval-pupal, pupal-ergin gelişim dönemlerinde deri değişimini başlatan hormondur [71].

Ekdisteroidlerin sentezi ve salgılanması beyinden üretilen protorasikotropik hormon (PTTH) tarafından kontrol edilir [16]. Beyinden hemolenfe salgılanan PTTH ile ekdisteroidler spesifik taşıyıcı proteinlere bağlanır. Taşıyıcı proteinler hemolenfte ekdisteroidlerin taşıma kapasitesini artıran özel moleküllerdir. Hormonun hücre membranından geçmesine yardım ederler [5].

Böceklerde organ ve dokuların yeniden şekillenmesinde etkili olduğu tespit edilen 20HE, larval organlarda programlanmış hücre ölümünü başlatan, aynı anda kök hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasını tetikleyen temel hormondur [6, 72].

Protorasik bezler her deri değişiminden önce ekdizon salgılar. 20HE'nun epidermal hücrelere doğrudan etkisi bu hücrelerin apolizi, hücre bölünmesi, eski kütikulanın sindirimi ve yeni kütikula salgılanmasına neden olur. Protorasik bezin holometabol böceklerde pupal safhanın başında; hemimetabol böceklerde ergin safhanın ilk birkaç gününde programlanmış hücre ölümü ile dejenere olduğu gösterilmiştir [5, 73].

Galleria mellonella larvalarının beslenme ve örme davranışları, hareketlilikleri ve larval görünüşleri dikkate alınarak ekdizon salınımları hakkında bilgi edinilebilmektedir. Larvaların larval deri değişiminden önce beslenmeyi kesmesi ve pupal deri değişiminden önce azalan hareket kabiliyetlerinin teşhisi, ekdisteroid konsantrasyonlarında meydana gelen piklerin belirlenmesinde kritik davranışlar olarak kabul edilmektedir [19].

2.4.1.1. Ekdizon Reseptörleri

Ekdizon reseptörleri (EcR), ekdisteroidlerin fizyolojik ve morfogenetik etkilerine karşı çeşitli böcek dokularının tepkisine aracılık eden, anahtar role sahip olan düzenleyici bileşenlerdir. Transkripsiyonel olarak aktif 20HE reseptörü oluşturmak için, EcR'nin başka bir nükleer reseptör ile heterodimer oluşturması gerekmektedir. Günümüze kadar incelenen tüm böcek ordolarında, ekdisteroid kaynaklı deri değiştirme ve metamorfozun düzenlenmesi, ekdizon reseptörü ve ultraspirakıl proteinden (USP) oluşan heterodimer aracılığıyla olduğu ortaya çıkmıştır [74, 75].

Ultraspirakıl reseptör proteini, 20HE tarafından transkripsiyonu düzenlenmesinde böcek genomundaki spesifik promotör elementleri tanıyan özel bir proteindir. Memelilerde retinoid X reseptörü (RXR) ile homologtur. Fonksiyonel böcek ekdizon reseptörünün, ekdizon reseptörü ve ultraspirakıl genlerinin ürünlerinden oluşan iki heterodimerize edici alt birim olan EcR ve USP'den oluştuğu *Drosophila melanogaster* [76, 77] ve *Bombyx mori*'de gösterilmiştir [78, 79].

Fonksiyonel hale gelen reseptör, ekdizona yanıt elemanları (EcRes) olarak isimlendirilen DNA dizilerine lokalize olur. Ekdizon seviyesi düşük olduğunda, EcR/USP liganda bağlı olmayan dimerler halinde gen ekspresyonunu baskılayıcı faktör olarak nükleusta bulunur. Liganda bağlandığında ise bir seri konformasyonel değişim geçirir, yapısına katılan koaktivatörlerin de etkisiyle ekdizona yanıt elemanlarına daha yüksek bir afinite ile bağlanarak gen ekspresyonunu başlatırlar [76, 77, 80].

Drosophila melanogaster'de yapılan çalışmalar ile ekdizon reseptörü izole edilerek steroid/tiroid hormon nükleer reseptör süper ailesi üyesi olduğu gösterilmiştir [81]. İlerleyen yıllarda bu ekdizon reseptörünün ortak DNA ve ligand bağlanma alanları olan üç farklı izoformu olduğu ancak, farklı promotörler ve alternatif splicing nedeniyle farklı N-terminal bölgelerine sahip oldukları bulunmuştur. Bu izoformlar EcR-A, EcR-B1 ve EcR-B2'dir [82] ve ekspresyonları dokuya özgü ve safhaya spesifik şekilde gerçekleşmektedir [82, 84].

Manduca sexta'da yapılan araştırmalarda ekdizon reseptörlerinin iki formu EcR-A [65] ve EcR-B1 [83] izole edilmiş olup *Drosophila melanogaster* EcR

izoformlarına benzer olduğu gösterilmiştir. Yapılan immünohistokimyasal çalışmalar EcR-A'nın ergin yapıları şekillendirmek üzere farklılaşacak doku ve hücrelerde baskın olduğunu belirlerken, EcR-B1'in ise tükürük bezi de dahil olmak üzere metamorfozda histolojik olarak yıkılan dokularda görüldüğünü belirlemiştir [82]. Dejenere olan dokularda EcR-B1 ekspresyonunun EcR-A'dan yüksek olması beklenmektedir [74]. Hem *Drosophila melanogaster* hem de *Manduca sexta*'ya ait birçok dokuda EcR ekspresyonunun en yüksek seviyesi son larval safhada metamorfozun başlangıcında gözlenmiştir [84]. EcR mRNA seviyesi, 20HE'na yanıt olarak artış göstermektedir [74].

Galleria mellonella'nın ipek bezinde, EcR-A ve EcR-B1'inde dahil olduğu nükleer reseptör süper ailesinin üyelerini kodlayan altı farklı transkriptin ifadesi (E75, GHR3, EcR ve USP) gelişim döneminde incelenmiştir. *Manduca sexta* ekdizon reseptörü izoformları EcR-A ve EcR-B1 için antisens cDNA problemlerinin kullanıldığı araştırmada in vitro 20HE ve JH-II uygulaması yapılmıştır. Araştırmanın sonunda, ipek bezlerinde EcR transkriptlerinin doğrudan 20HE tarafından düzenlendiği tespit edilmiştir [74].

2.4.2. Juvenil Hormon

Böceklerde yapısal olarak ilişkili beş molekül JH olduğu tespit edilmiştir. Bunlar; JH-0, JH-1, JH-II, JH-III ve 4-Metil JH-I molekülleridir. Hepside terpenoid olan juvenil hormonlar farnesenik asitten türetilen metil esterleridir. Terminal veya subterminal epoksi grubuna sahiptirler [5].

Böceklerde en yaygın olarak JH-III bulunur. Tüm ordolara ait böceklerde bulunduğu tespit edilmiştir. JH-0, JH-I ve JH-II yalnızca Lepidopterlerde bulunmaktadır. JH-0 ve 4-metil JH-I ise yalnızca lepidopter yumurtalarında bulunmaktadır [5].

JH, polar olmayan lipit benzeri bir moleküldür. Hücresel seviyede etki mekanizmasına ilişkin bilinenler oldukça sınırlıdır. Bunun nedenlerinden ilki, iki farklı sinyal mekanizması yoluyla etki etmesinden kaynaklanmaktadır. İlk olarak steroid hormon gibi nükleusta reseptörlerine bağlanarak etki gösterirken; ikinci olarak peptid hormon gibi davranır ve hücre yüzey reseptörüne bağlanarak fosfatidil inositol-aracılı

ikincil mesaj sistemini aktive ederek etki eder [6]. İkinci nedeni, JH'nun USP, taşıyıcı proteinler, membrana bağlı proteinler ve sitoplazma proteinleri gibi çok farklı proteinlere bağlanma kapasitesine sahip olmasıdır. Çeşitli proteinlere yüksek afinite ile bağlanabilme özelliği reseptör proteininin/proteinlerinin bulunmasını zorlaştırmaktadır [85].

JH, korpora allata tarafından hemolenfe salınır ve larval karakterlerin devamlılığını sağlar. Korpora allatanın JH salgılama aktivitesini ise sinir sistemi düzenler. Allatotropin olarak adlandırılan yaklaşık 13 aminoasitten oluşan nörosekresyon hormonları korpora allatadan JH salgılanmasını başlatır. Allatostatin ya da allatoinhibin'ler ise JH'nun sentezini inhibe eden nörosekresyon hormonlarıdır. JH, hemolenfte ekdisteroidlerde olduğu gibi, bazı özel proteinlere bağlanarak bulunabilir. Bu protein grubuna JH bağlayan proteinler denir. Bu proteinler sayesinde hemolenfteki çözünürlükleri gelişir, hormonların hücreye girişleri kolaylaşır, JH'ları yıkıma uğratan hemolenf esterazlardan da korunmuş olurlar [5].

JH'nun böceklerde hem metabolizmayı düzenleyici fonksiyonları hem de büyüme hormonu fonksiyonları vardır. Yağ doku tarafından vitellogenin proteini sentezinin gerçekleştirilmesi ve son larval safhada PTTH salınımını inhibe etmesi düzenleyici hormon fonksiyonlarıdır.

Holometabol böceklerde tipik bir larval evrede JH seviyesi larval safha süresince yüksektir. Deri değişiminden önce (~24 saat) düşer, seviyesi belirlenemeyebilir. Larval-larval deri değişiminden hemen sonra yine yükselişe geçer. Son larval evrede ise; başlangıçta yüksek olan JH seviyesi evre ilerledikçe düşüş gösterir hatta belirlenemeyecek düzeye geriler. Koza örmenin tamamlanmasının ardından meydana gelen büyük ekdizon piki ile eş zamanlı olarak seviyesinde yeniden artış olur. Yalnızca larval-pupal deri değişimi gerçekleşeceği zaman ekdizon ile birlikte seviyesinde artış görüldüğü ifade edilmektedir [5].

Son larval safhada dokuların JH'a son derece hassas oldukları kritik periyotların varlığı tespit edilmiştir. Bu kritik periyotlarda hemolenfte JH olması ya da olmaması metamorfozu yönlendirir. Büyüme hormonu fonksiyonu olarak kritik periyotlarda hemolenfte JH varsa gelişimsel bir değişim meydana gelmez. Mevcut

gelişim evresi devam eder. Bu durum “status quo” olarak bilinir. Ancak JH’a kritik periyotta JH hemolenfte yoksa, gen ekspresyonu değişir ve yeni gelişim süreci başlar. Kısacası holometabol böceklerde son larval safhada metamorfozun gerçekleşmesini sağlayan temel olay JH seviyesinin düşmesi değil, kritik periyotlarda hemolenfte bulunup bulunmamasıdır [5].

Juvenil hormon fizikokimyasal özellikleri ve çok çeşitlilikleri nedeniyle genellikle araştırması zor bir hormon olmuştur. Doğal JH’lar stabil olmayan moleküllerdir. Hemolenfteki çeşitli esterazlar ya da gün ışığı tarafından kolayca yıkılır. Saflaştırıldığında oda sıcaklığında bile yıkılır. Stabil olmayan bu kimyasal özellikleri JH’lar ile çalışmayı zorlaştıran bir diğer önemli faktördür. Bundan dolayı kimyasal özellikleri stabil olan, canlılar üzerinde JH etkilerini yaratan sentetik moleküller ile çalışmak tercih edilmektedir [5]. “Juvenil hormon analogları” olarak isimlendirilen bu kimyasal grubu fenoksikarb, methopren, hidropen gibi oldukça popüler bileşiklerden oluşmaktadır.

2.5. Fenoksikarb

“III. Nesil pestisitler” olarak adlandırılan böcek büyüme regülatörlerindedir. Böcek büyüme regülatörleri, pestisitlerin doğa ve canlılar üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için hedefleri böcek olan daha özel kimyasalların geliştirilmesi amacıyla üretilmiştir. Böceklerde hormon etkisi yaratarak endokrin sistemi hedef alırlar. Normal hormonal dengeleri bozarak böceklerin büyüme, gelişme ve üremelerine engel olurlar. Çevre üzerine indirgenmiş toksisite ve böcekler için spesifik olmaları nedeniyle zararlı böceklerle mücadelede klasik insektisitler yerine böcek büyüme regülatörlerinin kullanımının avantajları vardır. Dahası Lepidoptera gibi hedef zararlı böcekler üzerine spesifik etkileri olduğundan yararlı parazitlere ve predatörlere minimum toksisite gösterirler [86].

Günümüzde mevcut olan böcek büyüme regülatörlerinin çoğunluğu juvenil hormonun etki mekanizmasını taklit eden juvenil hormon analogları (JHA)’dır. Fenoksikarb, bu JHA’ları arasında en etkililerinden birisidir. JHA’nın böcekler üzerindeki spesifik etkisi ve omurgalılara karşı bilinen insektisitlerden daha az toksisiteye sahip olması, bileşeni değerli kılmaktadır.

Hiçbir sentetik JHA hedef organizmayı I. ve II. nesil geniş spektrumlu insektisitler gibi doğrudan toksik etki ile anında öldürmez. Bunun yerine gelişimsel anormalliklere yol açarak böceğin yaşamında telafisi olmayan gelişim ve üreme fonksiyonları bozukluklarına neden olur. Sonuç olarak böcek üreyemez ve zararları kontrol altına alınır.

Fenoksikarb, karbamat yapısına sahip olduğu halde asetilkolinesteraz inhibisyonuna neden olmamaktadır. Bu nedenle klasik karbamat ve organofosfatlı insektisitler gibi nörotoksik etkiye sahip değildir [83]. Sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Organik çözücülerde çözünürlüğü yüksektir.

İpek böceği *Bombyx mori*'de yapılan çalışmada fenoksikarbin JH'ı taklit ettiği gösterilmiştir [85]. Juvenil hormonun böcekteki fizyolojik etkilerini taklit etmesi ve JH'dan daha stabil yapıda olmaları nedenleriyle, JHA'ları böcek fizyolojisi çalışmalarında, JH'nun etkilerinin anlaşılması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır [87, 88, 89, 90].

2.6. Tezin Amacı

Böceklerde yağ dokunun tüm morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişimlerinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bilinmektedir [68]. Metamorfoz geçiren böceklerde, yağ dokuda meydana gelen olaylar bütün böceklerde aynı gibi görünüyorsa; yapılmış çalışmalar programlanmış hücre ölümü mekanizmalarının farklı zamanlarda sürece dahil olduğunu ve aralarında karşılıklı bir etkileşim olabileceğini ya da tek başlarına süreci yönetebileceklerini göstermiştir [11, 12, 13, 14, 91, 92]. Aynı ordoya ait farklı böcek türlerinde dahi, doku ve organların yeniden şekillenmesinde farklılıklar olduğu tespit edilmiştir.

JH ve 20HE, böceklerde büyüme ve gelişmeyi yöneten temel iki hormondur. 20HE'nun da dahil olduğu steroid hormonların, programlanmış hücre ölümünü başlattığı omurgalı ve omurgasız hayvanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [93, 94, 95, 96]. Hakkında en çok bilgiye sahip olunan böcek hormonu 20HE'dir. Bunun nedeni, reseptörlerinin bilinmesi ve etki mekanizmasının aydınlatılmasıdır. JH'nun etki mekanizmaları ile ilgili bilinenler ise halen sınırlıdır. *Galleria mellonella*'da yağ dokunun yeniden şekillenmesine ilişkin herhangi bir çalışma yoktur. Bu nedenle

gerçekleştirilen bu tez çalışması ile aşağıdaki verilerin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk amacı; *Galleria mellonella* yağ dokusunun yeniden şekillenme süreçlerinde meydana gelen programlanmış hücre ölümü süreçlerinin apoptotik ve otofajik özelliklerinin belirlenerek mevcut böcek fizyolojisi çalışmalarına alternatif bir model ortaya koymak;

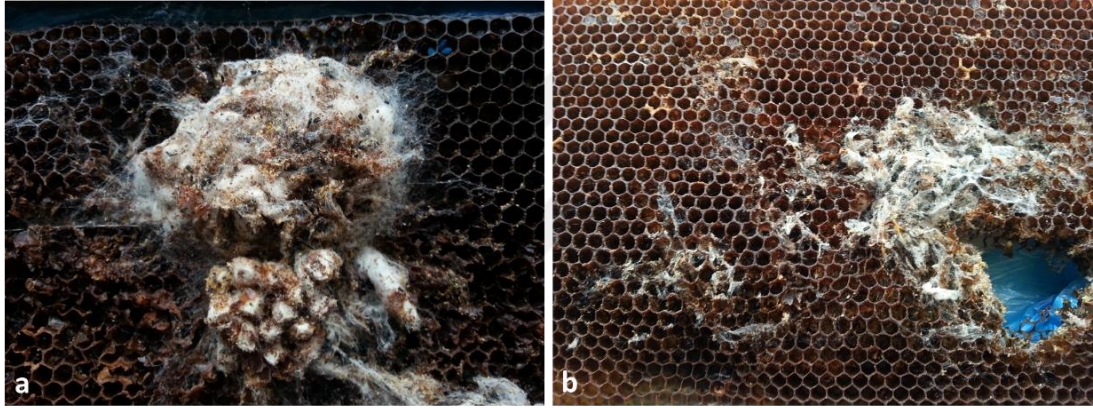
İkinci olarak; etki mekanizması aydınlatılmadığı için böcek fizyolojisi çalışmalarında ilgi odağı olan JH'nin yağ dokunun yeniden şekillenme süreçlerinde üstlendiği rolü bir JHA olan fenoksikarb uygulamasıyla ortaya çıkarmak ve tüm bu süreçlerde 20HE'nin yağ dokunun yeniden şekillenme süreçlerindeki etkisi, reseptör proteinin EcR-B1 ile bağlantılı olarak ortaya konması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. DeneY Hayvanlarının Elde Edilmesi

Bu çalışmada, büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* larva ve pupaları kullanılmıştır. Balıkesir-Havran civarındaki arıcılardan “güvelenmiş” olarak tabir edilen arı kovanlarındaki bal petekleri temin edilerek laboratuvar ortamına getirilmiştir (Şekil 3-1). Peteklerden ayıklanan *Galleria mellonella* larvaları kültür laboratuvarında beslenmeye devam ettirilerek erginleşmeleri ve yumurtlamaları sağlanmıştır. Yumurtadan çıkan larvaların erginleşmesiyle elde edilen bireylerin yumurtlamasıyla oluşan larvalar ile tez çalışması deneY düzeneği kurulmuştur.



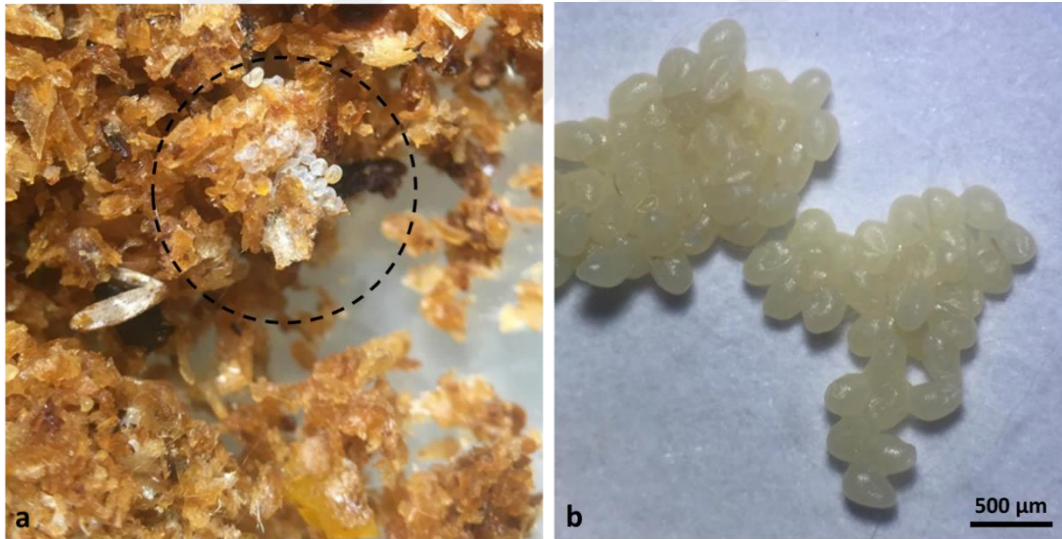
Şekil 3-1. Güvelenmiş bal petekleri; a) Doğal ortamında güvelenmiş bal peteklerinde bulunan pupalar, b) Larvaların petekte oluşturdukları tahribat.

3.1.2. DeneY Hayvanlarının Yetiştirilmesi

Galleria mellonella larvaları için standart bir yetiştirme metodu bulunmamaktadır. Çalışmamızda birçok benzer metot bir araya getirildiğinde ulaşılan veriler ile laboratuvar şartları optimize edilerek Bronskil [21]'in geliştirmiş olduğu besin, bal peteği, kepek, gliserol, bal ve su'dan oluşan yarı-sentetik besinde, kara petek miktarında artış gerçekleştirilerek kullanılmaya uygun bulunmuştur. Buna göre besin içeriği; kepek 420 g, kara petek 160 g, süzme bal 150 ml, gliserin 150 ml ve 30 ml su'dan oluşturulmuştur.

Ergin bireylerden elde edilen yumurtalar stereomikroskop altında sayılarak 300 yumurta 100 gr besin içeren petri kaplarında (150x25 mm) inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3-2). Kültür inkübatörde $30\pm 0,5$ °C sıcaklık ve $\%60\pm 5$ nem koşullarında karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar koşullarında larvaların yumurtadan çıkışı ortalama 6 gün, 1. instardan 6. instara geçiş ortalama 14 gün sürmüştür (Şekil 3-3). 6. instara geçen 50 larva içerisinde 100 gr besin bulunan petrilere alınmıştır (Şekil 3-4a). 6. instar sonunda deri değişimi geçirecek olan ve baş kapsülü kaymış larvalar seçilerek besin içermeyen, başka bir petriye aktarılmıştır. Deri değişiminin ardından 7. instarın ilk 24 saati 0. gün olarak isimlendirilmiştir. 50 mg'ın altındaki 0. gün larvaları deneye katılmamıştır (Şekil 3-4b). 7. instar 0. güne ait 20 larva 100 gr besin içeren kavanozlar içerisinde, inkübatörde kültüre edilmeye devam edilmiştir (Şekil 3-5).

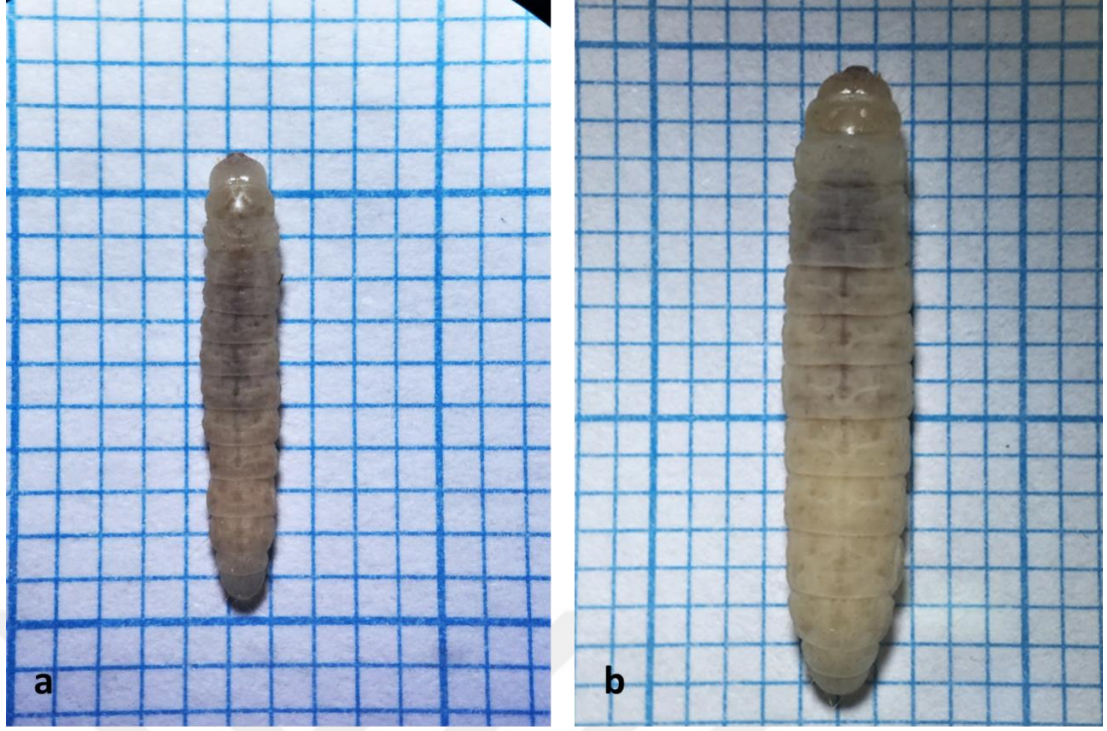
Fenoksikarb uygulaması yapılan 7. instarın 0. gün larvaları farklı bir laboratuvarda, farklı bir inkübatörde beslenmiştir.



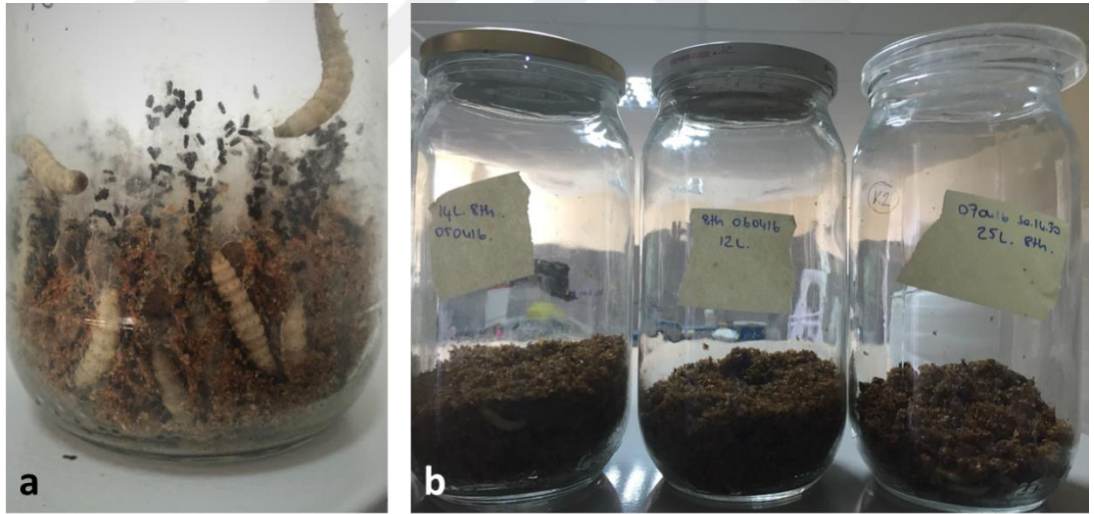
Şekil 3-2. *Galleria mellonella* yumurtaları; a) Besi ortamında yeni çıkan larvaların bırakmış olduğu boş yumurta kabukları, halka ile işaretlenmiştir, b) İnkübe edilecek yeni bırakılmış yumurtalar.



Şekil 3-3. Erken gelişim evrelerinde *Galleria mellonella* larvaları; a) Birkaç günlük larva, b) Beslenen *Galleria mellonella* larvası, c) Petri kabında beslenen farklı gelişim evrelerindeki larvalar.



Şekil 3-4. Yeni deri değiştiren *Galleria mellonella* larvaları; a) 6. instar, b) 7. instar.

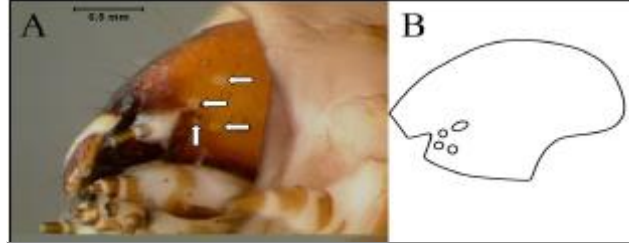


Şekil 3-5. a) 7. instar *Galleria mellonella* larvaları gezinme ve örme davranışı, b) 5 µg fenoksikarb uygulamasının ardından beslenen 8. instar larvaları.

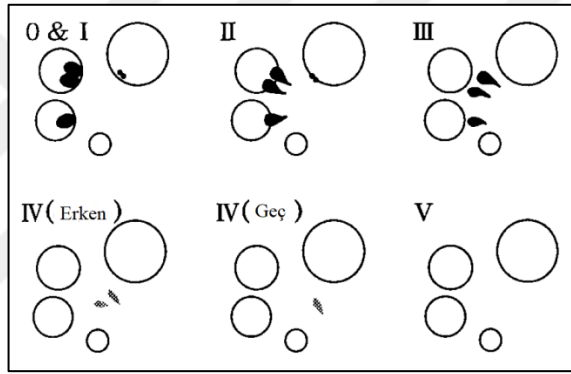
3.1.3. Larvaların Gelişim Safhalarına Ayrılması

7. instar *Galleria mellonella* larvaları gelişimsel olarak Uwo et al., [62] ve Khoa and Takeda'nın [97] kullanmış oldukları sınıflandırma sistemi model alınarak, stemmatadan pigmentlerin göç derecesine göre 6 ayrı safhada incelenmiştir. Larvaların baş kapsülünde bulunan “stemmata” yapıları Şekil 3-6.'da, stemmatadan

pigmentlerin göçüne göre yapılan sınıflandırma aşamaları ise Şekil 3-7'de gösterilmiştir.



Şekil 3-6. *Galleria mellonella* larvası baş kapsülünde bulunan stemmata; A) Baş kapsülündeki stemmata, B) Baş kapsülü ve stemmata şematik gösterimi [1].



Şekil 3-7. Larvalarda pigmentlerin stemmatadan göçü temel alınarak geliştirilen sınıflandırma şeması [62].

- Safha 0 (S0)-** Halen beslenmekte olan tam gelişmiş larva, stemmatada pigment normal pozisyonunda ve normal yoğunlukta.
- Safha I (S1)-** Beslenmeden kesilmiş, gezinme davranışı gösteren, örmeye başlayacak larva, pigment halen normal pozisyonunda.
- Safha II (S2)-** Yeni koza ören larva, pigment stemmatadan beyine göç etmeye başlamış.
- Safha III (S3)-** Larva koza örmenin orta evrelerinde, pigmentlerin çoğu stemmatadan beyine göç etmiş fakat, en azından bir tanesi halen kutikula ile temas halinde bulunuyor.
- Safha IV (S4)-** İleri koza ören larva evresi, pigmentler ayrı iki küme halinde gömülmüş veya kutikulanın altında tek bir kitle olarak kalmış.

Safha V (S5)- Prepupa, örme davranışını kesmiş, kısalmış vücut ve sıkışmış abdominal segmentler ile karakterize edilir, pigment görülüyor.

Pupal deri değişiminin ardından ergin olana kadar böceklerin gelişimi 24 saatlik periyotlar esas alınarak sınıflandırılmaya devam edilmiştir.

3.1.4. Fenoksikarb

Deneyde ticari olarak elde edilen juvenil hormon analogu “Fenoksikarb” (Fluka, 34343) kullanılmıştır. Fenoksikarbın [2(fenoksi-fenoksi)-etil karbamat] molekül formülü $C_{17}H_{19}NO_4$ olup, 301,3 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir. Katı bir kimyasaldır, asetonda çözdürülerek larvalara topikal olarak uygulanmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Juvenil Hormon Analogu Fenoksikarbın Uygulanması

Fenoksikarb stok solüsyonu, 10 µg/2,5 µl olmak üzere asetonda çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır. Stok solüsyon seyreltilerek doz denemeleri gerçekleştirilmiştir. Fenoksikarbın ön denemelerde larvalara uygulama miktarları Tablo 3-1’de verilmiştir.

Tablo 3-1. Fenoksikarb uygulama planı. * Eşit miktarda aseton uygulanan ancak fenoksikarb uygulaması yapılmayan kontrol grubu.

Deney Grubu	Uygulanan Doz Miktarı	Uygulama yapılan Larva Sayısı
1. Deney Grubu	100 ng	10 x 3
2. Deney Grubu	250 ng	10 x 3
3. Deney Grubu	500 ng	10 x 3
4. Deney Grubu	750 ng	10 x 3
5. Deney Grubu	1 µg	10 x 3
6. Deney Grubu	2 µg	10 x 3
7. Deney Grubu	5 µg	10 x 3
8. Deney Grubu	10 µg	10 x 3
Kontrol Grubu*	-	10 x 3

Ön denemelerde herbir uygulama için 7. instarın 0. gününe ait 10'ar larvadın oluşan gruplar oluşturulmuştur. Uygulama yapılan gruplardan ayrı olarak 10 larvadın oluşan kontrol grubu fenoksikarb içermeyen eşit miktarda (2,5 µl) çözünen (aseton) uygulamasına maruz bırakılmıştır. Larvalarda 24 saatlik periyotlar esas alınarak morfolojik değişim olup olmadığı incelenmiştir. Her bir ön deneme uygulaması 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.2.2. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi

Bu dozlar arasından, larvaların çoğunluğunda (%70) aynı etkiyi yaratan ve istikrarlı sonuç alınan 5 µg dozun uygulama dozu olduğuna karar verilerek ileri aşama çalışmalara geçilmiştir. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait rastgele seçilen 10 larva ve/veya pupa 7. instarın 0. gününden itibaren beslendiği süreçte ve pupal evrede 24 saat aralıklar esas alınarak her gün aynı saatte, metamorfoza girenlerde ise S1-S5 gelişim dönemleri esas alınarak hassas terazide ağırlıkları tartılmıştır. Elde edilen veriler kaydedilerek 5 µg fenoksikarbin etkisi ile meydana gelen vücut ağırlığı değişimlerinin kontrol grubuyla karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır.

3.2.3. Yağ Dokunun Elde Edilmesi

Diseksiyonu gerçekleştirilecek larva ve pupalar buz üzerinde 2-3 dakika bekletilerek bayıltıldı. Ardından parafin küvet üzerinde dorsalden açılarak bağırsağın her iki yanından periviseral yağ doku örnekleri alındı. Elde edilen dokular fizyolojik su (PBS) ile yıkandıktan sonra enzim aktiviteleri ve western blotting denemeleri için mikrosantrifüj tüplerine alınarak -80°C'de muhafaza edildi. Histoloji, histokimya, TEM ve TUNEL yöntemleri için uygun fiksatiflere alındıktan sonra parafin veya araldit bloklar hazırlandı.

3.2.4. Yağ Dokunun Histolojisi

Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarına ait larva ve pupaların yağ dokusu ışık mikroskobu seviyesinde, histolojik yapılarının belirlenmesi amacıyla preparasyonu yapıldı. Histolojik incelemeler için alınan dokular Bouin fiksatifi içerisinde oda sıcaklığında 24 saat boyunca fikse edildi. Ardından %70 alkol içerisinde alınan dokuların parafine gömme işlemi gerçekleştirilene kadar +4°C'de muhafaza edildi. Dokular, rutin histolojik prosedür uygulanmasının ardından parafine gömülmüş

bloklar hazırlandı. Hazırlanan bloklardan mikrotomda 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve HE, PAS boyama yöntemleri ile boyandı. Kontrol grubu ve 5 µg fenoksikarb uygulama yapılan gruba ait kesitler histolojik açıdan karşılaştırılmalı olarak incelendi ve Zeis Axio Scope marka mikroskopta fotoğrafları çekildi.

Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

Bouin Fiksatif: 75 ml Pikrik asit, 25 ml %40'lık formaldehit ve 5 ml glasiyal asetik asit karıştırılır.

Gill hematoksilen: 250 ml etilen glikol, 750 ml distile suda çözündürülür. 6 gr hematoksilen, 0,6 gr sodyum iyodat, 80 gr alüminyum sülfat ve 20 ml glasiyal asetik asit sırasıyla ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 1 saat oda sıcaklığında karıştırılır. Koyu renkli şişede oda ısısında iki hafta boyunca olgunlaşması beklenir.

Eozin: 1gr eozin, 100 ml %70 alkol, 5 ml glasiyal asetik asit ile hazırlanır.

%1 Periodik Asit: 1 gr periodik asit, 100 ml saf suda çözündürülür.

Schiff: 200 ml distile su kaynatılır. 1 gr bazik fuksin eklenir, 50°C'ye soğutulur. 2 gr K₂S₂O₅ eklenir ve karıştırılır, oda sıcaklığına soğutulur. 2 ml konsantre HCl eklenir. Gece boyu karanlıkta bekletilir. 0,2 gr aktif kömür eklenir, 1-2 dakika çalkalandıktan sonra filtre kâğıdı aracılığıyla süzülür. Solüsyon sarıya dönük berrak renktedir. +4°C'de saklanır.

Hematoksilen&Eozin Boyama Prosedürü

1. Kesitlerin deparafinizasyonu (Ksilol 2x15 dk.)
2. Hidratasyon (Azalan alkol serileri; %100, %96, %70)
3. Saf su, 5dk.
4. Boyama 1: Hematoksilen, 5 dk.
5. Akarsuda mordantlama, 5 dk.
6. Saf su (Çalkalama)
7. Boyama 2: Eozin, 1 dk.
8. Saf su ile yıkama
9. Dehidratasyon basamakları (Artan alkol serileri; %70, %96, %100)
10. Şeffaflaştırma (Ksilol 2x15 dk.)
11. Kapatma (Entellan)

Periodik Asit Schiff (PAS) Boyaması Prosedürü

1. Kesitlerin deparafinizasyonu (Ksilol 2x15 dk.)
2. Hidratasyon (Azalan alkol serileri; %100, %96, %70)
3. %1'lik Periodik asit ile muamele, 5 dk.
4. Boyama 1: Schiff, 15 dk.
5. Yıkama (Akarsuda doku pembeleşene kadar, yaklaşık 2-5 dk.)
6. Saf su (Çalkalama)
7. Zıt boyama: Hematoksilen, 1-2 dk.
8. Akarsuda mordantlama, 2-5 dk.
9. Dehidratasyon basamakları (Artan alkol serileri; %70, %96, %100)
10. Şeffaflaştırma (Ksilol 2x15dk.)
11. Kapatma (Entellan)

Pozitif kontrol olarak kullanılan böcek orta bağırsağına ait kesite aynı prosedür uygulanmıştır.

3.2.5. Otofajik Vakuollerin Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Belirlenmesi

Yağ doku disekte edildikten sonra modifiye Karnovsky [98] fiksatifine alınmıştır. Aşağıda belirtilen gömme prosedürüne uyularak araldit bloklara gömülmüştür.

Kullanılan Kimyasallar

Karnovsky Fiksatif: 0,1 M sodyum fosfat tamponunda (sörensen tamponu) %2,5 tamponlu glutaraldehit ve %2 paraformaldehit ile hazırlanmıştır (pH 7,4).

Doku Gömme Protokolü

1. Doku en az gece boyu +4°C'de fikse edilmiştir.
2. 3 x 15 dk. 0,1 M sodyum fosfat tamponunda hazırlanan 0,1 M sükröz ile yıkanmıştır.
3. 90 dk %2 sodyum fosfatla tamponlanmış osmiumtetraoksit (pH 7,4) ile post fiksasyon yapılmıştır.
4. 3 x 15 dk. 0,1 M sodyum fosfat tamponunda yıkanmıştır.
5. 2x 15 dk. %50 asetonda dehidratasyon yapılmıştır.

6. %70 aseton ve %0,5 uranilasetat ve %1 fosfotungstik asitte +4°C'de gece boyu karşıtlık verilmiştir.
7. 2 x 15 dk. %80 aseton
8. 2 x 15 dk. %90 aseton
9. 2 x 15 dk. %96 aseton
10. 3 x 20 dk. %100 aseton
11. 2 x 15 dk. propilenoksit uygulaması yapıldıktan sonra,
12. 30 dk. 2:1 propilen oksit: araldit karışımında,
13. 30 dk. 1:1 propilen oksit: araldit karışımında,
14. 30 dk. 1:2 propilen oksit: araldit karışımında muamele edilmiştir.
15. Gece boyu araldit solüsyonunda bekletilmiştir.
16. Yeni araldit solüsyonuna alınmıştır.
17. Polimerizasyonu sağlamak amacıyla ~48 sa. 65°C'de inkübatöre alınmıştır.
18. Hazırlanan bloklardan ultramikrotom ile 100-120 nm kalınlığında kesitler alınmıştır.
19. Kesitler bakır gridler yardımıyla durulanmıştır.
20. Post kontrastyon Reynolds [99]'e göre gerçekleştirilmiştir:
 - a. 10 dk. %8 uranil asetat muamelesi
 - b. 5 dk. %0,7 leadsitrat ve %0,9 sodyum sitrat muamelesi
 - c. Yaklaşık 15 dk. sonra transmisyon elektron mikroskopunda inceleme yapılmıştır.
21. Görüntüleme TEM 100-Plus (120kv) Electron Microscope ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. DNA Fragmentasyonunun TUNEL Yöntemiyle Belirlenmesi

Disekte edilen yağ doku örnekleri %10 nötral formalinde 24 saat oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Rutin histolojik işlemlerden geçirildikten sonra parafin bloklar hazırlanmış ve 5 µm kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alınmıştır. TUNEL Boyama kiti (Roche In situ cell detection kit, Cat. no. 11 684 795 910) talimatları esas alınarak prosedür yağ doku için uyarlanmıştır. Prosedüre ek olarak nükleer karşıt boyama için DAPI (Sigma, D8417) kullanılmıştır.

Alınan kesitler şeffaflaştırıldıktan sonra (2x15 dk. ksilol), azalan alkol serilerinden geçirilerek dokuların sulandırılması sağlanmıştır (%100, %96, %70; 10'ar dk.). Kesitler distile suda 5 dk. bekletilip, PBS (pH 7,4) ile yıkanmıştır (2x3 dk.). DNA'ya bağlı protein moleküllerinin uzaklaştırılması ve spesifik olmayan boyanmaların engellenmesi için kesitler, 25°C oda sıcaklığında proteinaz K ile 45 dk. muamele edilmiştir. Ardından PBS ile yıkanan kesitlerin etrafı toz bırakmayan bir bez yardımıyla kurulanmıştır. Her bir kesit için 50 µl olacak şekilde TUNEL reaksiyon karışımı (45 µl işaretleme (label) solüsyonu+ 5 µl TdT enzim solüsyonu) hazırlanıp kesitlerin üzerine pipet ile eklenmiştir. Negatif kontrol için ayrılan kesit üzerine 50 µl TdT enzim solüsyonu içermeyen, işaretleme solüsyonu eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak Merck 90422 kodlu hazır pozitif kontrol kesiti (sütten kesildikten sonraki 4. günde sıçan meme bezi dokusu, 18 saat %10 nötral tamponlu formalinde fikse edilmiş, parafine gömülmüş ve 5 µm kalınlığında alınmış kesit) kullanılmıştır. 37 °C'de nem odasında karanlıkta 1 saat inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için PBS ile 2-3 kez yıkama yapılmıştır. Karşıt boyama için kesitlerin üzerini örtecek kadar PBS'de hazırlanan 100 ng/ml DAPI çalışma solüsyonu eklenerek, oda sıcaklığında karanlıkta 15 dk. bekletilmiştir. Süre sonunda reaksiyon PBS ile 2-3 kez yıkanarak durdurulmuştur. Kesitlerin etrafı toz bırakmayan bir bez yardımıyla silindikten sonra solma karşıtı kapama solüsyonu (ProLong Gold antifade, Cat. No. 36930) ile kapatılarak 24 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. Kesitler Olympus IX53 marka inverted Floresan mikroskobunda incelenerek fotoğraflanmıştır. TUNEL yöntemi için kesitler 450-500 nm excitation, 515-565 nm detection dalga boyu aralığında, DAPI için 364 nm excitation ve 454 nm emmision dalga boyunda incelenerek görüntülenmiştir. Aynı alandan çekilen TUNEL ve DAPI işaretlemelerine ait fotoğraflar kameranın yazılımı kullanılarak bir araya getirilmiş "Merge" görüntüleri elde edilmiştir.

Hazırlanan Kimyasallar

%10 Nötral Formalin (pH 6,8): 100 ml %40'lık formaldehit, 900 ml distile su, 4g/lit NaH_2PO_4 (monobazik), 6,5g/lit Na_2HPO_4 (dibazik) ile karıştırılır.

PBS: 145 mM NaCl, 8.55 mM Na_2HPO_4 , 1.45 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5) hazırlanır.

Proteinaz K Çalışma Solüsyonu: (10-20µg/ml 10mM Tris/HCl, pH 7.4-8): 0,12 gr Tris, 75 ml distile suda çözülür. PH'ı 1N HCl ile 7,4'e getirilir. Distile su ile hacim

100 ml'ye tamamlanır. 0,001 gr- 0,002 gr Proteinaz K (Sigma, P6556) eklenerek, karıştırılır. +4°C'de muhafaza edilir.

DAPI Çalışma Solüsyonu: (100 ng/ml ya da 300 nM, PBS): 10 mg DAPI, 2 ml dimetilformamid (N, N-Dimetil Formamid, Merck) içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlanır. Hazırlanan stok solüsyondan 2 µl çekilerek, 50 ml PBS içerisinde seyreltilir ve çalışma solüsyonu hazırlanır. Çalışma solüsyonu +4°C'de muhafaza edilir. Stok solüsyon ise kısımlara bölünerek -20°C'de saklanır.

3.2.7. Spesifik Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

-80'de muhafaza edilen yağ doku örnekleri tartılarak yeni mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Homojenizasyon tamponu eklenerek buz üzerinde homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemi PTFE uçlu havan ve ona uyumlu hücre parçalama tüpü (Sigma P7734-1EA) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Homojenat 16.000 g'de 20 dakika +4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant ayrı tüpe alınarak enzim ve protein kaynağı olarak kullanılmıştır. Örneklerdeki protein miktarı Bradford yöntemi uygulanarak tayin edilmiştir.

Total Protein Tayini

Bradford Reaktifi: 0,1 g Comassie Brilliant Blue G (Sigma, B5133) 50 ml %95 etanolde çözülür. 100 ml %85 fosforik asit ile karıştırılır. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

BSA (Bovin Serum Albumin) Stok (2 mg/ml): 20 mg BSA (Sigma, A2153) 10 ml saf suda çözülür. 1 ml'lik kısımlara bölünerek -20°C'de muhafaza edilir.

Homojenizasyon Tamponu: 50 mM HEPES (pH: 7,5) tampon içerisinde 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, % 0,1 CHAPS, % 10 sükröz, 5 mM DTT, % 0,5 Triton x-100, % 4 gliserol hazırlandıktan sonra 1 proteaz inhibitör kokteyli (Roche, 11836153001) eklenir. -20°C'de 1 yıl saklanır.

BSA Standartların Hazırlanması ve Örneklerde Protein Tayini

1. Hazırlanan BSA stoğundan 2 mg/ml; 1,5 mg/ml; 1 mg/ml; 0,75 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,025mg/ml ve 0 mg/ml seyreltmelerde standart solüsyonları hazırlanmıştır.
2. 5 µl standart dilüsyonu ve/veya 5 µl örnek, 250 µl Bradford reaktifi ile ependorfta karıştırılır. Örnekler ve standartlar oda sıcaklığında 5 dk.

inkübasyonun ardından 595 nm'de spektrofotometrede okutulmuştur. Ölçümler 3 tekrarlı yapılmıştır.

3. Standart grafiğini oluşturmak amacıyla: standart seyreltmelerinin okutulması sonucu elde edilen absorbansa karşılık içerdikleri protein miktarları ile XY dağılım grafiği çizilir ve denklem elde edilir. Elde edilen denklem kullanılarak örneklerdeki total protein miktarı tespit edilmiştir.
4. Spesifik enzim aktivitesini hesaplamak amacıyla gerekli olan örneklerin 1 g'ında mg cinsinden protein miktarları belirlenmiştir.

Spesifik Kaspaz 3 Enzim Aktivitesi Tayini

AMC Stok Solüsyonu (10 mM): 1 mg AMC (Enzo, BML-KI144) 0,57 ml DMSO'da çözülür. -20°C'de saklanmıştır.

AMC Çalışma Solüsyonu (500 µM): 10 mM AMC Stok solüsyonun homojenizasyon tamponunda seyreltilmesi ile elde edilmiştir.

Ac-DEVD-AMC Substratı Stok Solüsyonu (10 mM): 2,5 mg Ac-DEVD-AMC (Cayman, 14986) substratının 370 µl DMSO'da çözülerek hazırlanır. -20°C'de saklanmıştır.

Ac-DEVD-AMC Substratı Çalışma Solüsyonu (400 µM): Ac-DEVD-AMC substratı stok solüsyonu homojenizasyon tamponunda seyreltilmesi ile elde edilmiştir. -20°C'de saklanmıştır.

Ac-DEVD-CHO İnhibitörü Stok Solüsyonu (2 mM): 0,5 mg Ac-DEVD-CHO (Enzo, ALX-260-030)'nun 500 µl DMSO'da çözülerek hazırlanmıştır.

Ac-DEVD-CHO İnhibitörü Çalışma Solüsyonu (200 µM): 2mM Ac-DEVD-CHO inhibitörü stok solüsyonunun homojenizasyon tamponunda seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

AMC Standartların Hazırlanması:

1. AMC çalışma solüsyonundan 100 µl'de 0,1 nmol; 0,05 nmol; 0,03 nmol; 0,0198 nmol; 0,0132 nmol; 0,0066 nmol; 0,0033 nmol; 0,00165 nmol; 0,000825 nmol ve 0 nmol seyreltmelerde standart solüsyonları hazırlanmıştır.
2. Kuyucuklara 100 µl hacimde koyulur. 385 nm eksitasyon ve 460 nm emmision aralığında 37 °C'de 3 saat 15 dk. aralıklarla okuma yapılmıştır.

3. Absorbansa karşılık AMC miktarları ile XY dağılım grafiği çizilir ve denklem elde edilir. Denklem ile yağ doku örneklerindeki oluşan AMC miktarı tayin edilmiştir.

Örneklerde Spesifik Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

1. Stok solüsyonlar hazırlandıktan sonra spesifik kaspaz 3 enzim aktivitesini belirlemek için; kuyucuklara 120 µg protein içeren homojenat, Ac-DEVD-AMC substratı çalışma solüsyonu 100 µM olacak şekilde eklenir, son hacim 100 µl' ye homojenizasyon tamponu ile tamamlanır. Tüm aşamalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.
2. 120 µg protein içeren homojenat, Ac-DEVD-AMC substratı çalışma solüsyonu 100 µM olarak eklenir ve Ac-DEVD-CHO inhibitörü çalışma solüsyonu 200 µM olacak şekilde eklenir, son hacim 100 µl'ye homojenizasyon tamponu ile tamamlanmıştır. Substrat ve homojenizasyon tamponu içeren kör hazırlanmıştır.
3. 385 nm eksitasyon ve 460 nm emmisyon aralığında 37°C'de 3 saat 15 dk. aralıklarla okuma yapılmıştır.
4. Kör absorbans değerleri, örnekler için elde edilen absorbans değerlerinden çıkartılmıştır. Her bir örneğe ait absorbans ortalamaları elde edilip ve inhibitör eklenen örneklerin okuma değerleri bu ortalamalardan çıkartılmıştır.
5. Standart olarak kullanılan AMC dilüsyonlarının absorbans değerleriyle hazırlanan XY dağılım grafiğine ait denklem, örneklerdeki kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.
6. Unit cinsinden 1 g dokuda kaspaz 3 enzim aktivitesi belirlenmiştir.
7. 1 g dokudaki protein ve enzim aktivitesi belirlendikten sonra 1 mg proteindeki enzim miktarları hesaplanarak unit/mg protein cinsinden spesifik kaspaz 3 enzim aktivitesi belirlenmiştir.
8. Yöntem Denton and Kumar'a [100] göre yapılmıştır.
9. Pozitif kontrol olarak apoptotik ajan Docetaxel (Sigma, 114977-28-5) ile muamele edilmiş meme hücre kültürü kullanılmıştır.

3.2.8. Spesifik Asit Fosfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

-80°C'de muhafaza edilen yağ doku örnekleri tartılarak yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.

Asit Fosfataz Enzim Aktivitesi Analizi Basamakları:

1. Dokular -80°C'den çıkarılarak 37 °C'de 3 dk. süresiyle çözdürülmüştür.
2. Tartılarak yeni mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.
3. 1000 ml %0,9'luk NaCl ile 1'er dk. teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edilmiştir.
4. Homojenize edilen dokular 8000 g'de +4°C'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüjlenen dokuların süpernatantı ayrı tüplere alınmıştır.
6. Asit fosfataz tayininde substrat olarak p-nitrofenil fosfat (Sigma, N4645) kullanılmıştır.
7. Standartlar için p-nitrofenol (Sigma, 241326) kullanılmıştır.
8. Spesifik enzim aktivitesini hesaplamak amacıyla 1 g dokudaki mg cinsinden protein miktarları belirlenmiştir.
9. Asit fosfataz enzimi aktivite tayini için ölçümler Bergmeyer et al., [101]'a göre yapılmıştır.

Kimyasalların Hazırlanması

Sitrat Tamponu: 90 mM, pH 4,8

0,789 g sitrik asit, 1,54 g sodyum sitrat 100 ml'ye tamamlanmıştır. Tamponun pH'sı 4,8'e ayarlanmıştır.

0,1 N NaOH Solüsyonu (Durdurucu): pH'ı nötrleyip reaksiyonu durdurur. 4 g NaOH 1 lt saf suda çözdürülmüştür.

p-nitrofenil Fosfat Solüsyonu (Substrat): 20 ml sitrat tamponu içerisinde 0,0027 g p-nitrofenil fosfat çözdürülmüştür.

Standartların Hazırlanması:

p-nitrofenol: Standartların hazırlanmasında tepkimede oluşan son ürün kullanılır. Artan konsantrasyonlarda hazırlanarak spektrofotometrede 405 nm'de okutulmuş, standart grafiği oluşturulmuştur. 0,00139 gr p-nitrofenol 10 ml sitrat tamponunda çözdürülmüştür. Her seferinde bu hazırlanan çözeltiden aşağıdaki miktarlarda standartlar hazırlanmıştır. Üzerleri NaOH ile 1,4 ml'ye tamamlanmıştır.

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

Total Protein Tayini: Total protein tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Ölçüm boyanın (Commassie Blue) proteinine bağlanmasıyla oluşan kompleksin molar absorbansı artırmasına dayanır. Kaspaz 3 enzim aktivitesi tayini için hesaplanan değerler kullanılmıştır. Ölçümler 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Protokol

1. Stok solüsyonlar hazırlanmıştır.
2. Homojenatlardaki asit fosfataz enzim aktivitesini belirlemek için;
100 µl sitrat tamponu,
100 µl p-nitrofenil fosfat,
200 µl homojenat ependorf içerisinde karıştırılarak 30 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir.
3. Reaksiyon 1 ml 0,1 N NaOH ilavesiyle durdurulmuştur.
4. Örnekler ve standartlar Agilent Cary 50 UV-Vis spektrofotometre ile 405 nm'de okutulmuştur.
5. AF için standart grafiği çizilip örneklerin her birinin asit fosfataz miktarları belirlenmiştir.
6. Ardından unit cinsinden 1 g dokudaki asit fosfataz miktarları hesaplanmıştır.
7. 1 g dokudaki protein miktarı ve asit fosfataz miktarı belirlendikten sonra, 1 mg proteindeki enzim miktarı hesaplanarak unit/mg protein cinsinden spesifik enzim aktivitesi belirlenerek yorum yapılmıştır.

3.2.9. Ekdizon Reseptörü EcR-B1'in Western Blotting ile Belirlenmesi

-80'de bulunan yağ doku örnekleri tartılarak yeni mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. İçerisine homojenizasyon tamponu eklenmiştir. Homojenizasyon buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. PTFE uçlu havan ve ona uyumlu hücre parçalama tüpü

kullanılmıştır. 16.000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant protein kaynağı olarak kullanılmıştır. Örneklerdeki protein miktarı BCA (Bicinchonic asit) yöntemi uygulanarak Pierce™ BCA Protein Assay Kit talimatları esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

EcR-B1 proteini yaklaşık 64 kDa ağırlığındadır. İmmüno blotting çalışmalarında 70-80 kDa ağırlığında bulunduğu ifade edilmektedir [74, 83].

Homojenizasyon Tamponu: 20 mM Tris-HCl (pH: 7,5) hazırlanarak, %0,5 non-idet P-40 ve proteaz inhibitör kokteyli (Roche, 1836153001) ilave edilmiştir. Tampon taze olarak hazırlanmış ve çalışma süresince +4 °C'de tutulmuştur.

BCA Protein Tayin Yöntemi

Pierce™ BCA Protein Assay Kiti (23250) kullanılmıştır.

Kullanılan solüsyonlar:

Uyumluluk Reaktifi Stok Solüsyonu (Compatibility Reagent Stock Solution): 1 ml 1:1 oranında seyreltilen çalışma sulandırma tamponunun uyumluluk reaktifi stok tüpüne aktarılması ile hazırlanmıştır.

BCA Standart Çalışma Ayırıcı: 50 hacim çözelti A, 1 hacim çözelti B ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

BSA Standartlarının Hazırlanması: 2 mg/ml BSA stok solüsyonundan 2 µg/µl; 1,5 µg/ µl; 1 µg/µl; 0,75 µg/µl; 0,5 µg/µl; 0,25 µg/µl; 0,125 µg/µl seyreltmelerde standart solüsyonları hazırlanmıştır.

1. Protein miktarı tayin edilecek standart, örnek, standart kör ya da örnek köründen 25 µl, 1,5 ml lik santrifüj tüpüne pipetlenmiştir.
2. Uyumluluk reaktifi stok solüsyonun'dan 25 µl santrifüj tüpüne eklenerek hafifçe karıştırılmıştır.
3. 37°C de 15 dk. su banyosunda santrifüj tüpleri içinde inkübe edilmiştir.
4. Tüplere 1 ml BCA standart çalışma ayırıcı eklenmiştir. Tüpler iyice karıştırılarak 37°C de 30 dk. inkübe edilmiştir.
5. Tüpler oda sıcaklığına gelene kadar 5-10 dk. beklenmiştir.
6. Ölçümü yapılacak örnekler tüplerden küvetlere alınarak spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir.

7. Absorbansa karşılık konsantrasyon XY dağılım grafiği çizilerek eğri denklemi elde edilmiştir. Elde edilen denklem sonucuna göre okutulan örneklerde protein miktarı tayini gerçekleştirilmiştir.

SDS'li Poliakrilamid Jelin Hazırlanması ve Kullanılan Solüsyonlar

%7,5'lük Yürütme Jelinin Hazırlanması (Resolving Gel)

Akrilamid/bis	2,5 ml
Ultra saf su	4,85 ml
pH: 8.8 Tris-HCl	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	50 µl
<u>TEMED</u>	<u>5 µl</u>
Total hacim	10ml

%4'lük Yığınlama Jelinin Hazırlanması (Stacking Gel)

Akrilamid/bis	1,3 ml
Ultra saf su	6,1 ml
pH: 6.8 Tris-HCl	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	50 µl
<u>TEMED</u>	<u>10 µl</u>
Total hacim	10 ml

Yürütme jelinin polimerleşmesinden sonra yığınlama jeli dökülmüştür. Yığınlama jelinin polimerleşmesinin ardından 1x konsantrasyonunda jel yürütme tamponu içerisine alınmıştır.

Stok Solüsyonların Hazırlanması

Akrilamid-Bis (%30 T, %2,67 C)

Akrilamid	29,2 g
N'N' bis metilen akrilamid	0,8 g

Kimyasallar ayrı ayrı ultrapür suda çözdürülmüştür. Her iki karışım karıştırılmıştır. Son hacim ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra +4°C'de koyu renkli şişede saklanmıştır.

Yürütme (Resolving) Jeli Tamponu: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

Trisma base 18,15 g

Ultra saf su 80 ml

pH 10M HCl ile 8,8'e ayarlanmıştır. Son hacim ultrapür su ile 100 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de koyu renkli şişede saklanmıştır.

Yığınlama (Stacking) Jeli Tamponu: 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

Trisma base 6 g

Ultra saf su 60 ml

pH HCl ile 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim ultrapür su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. +4°C'de karanlık şişede saklanmıştır.

%10 SDS: 1 g sodyum dodesil sülfat (Sigma, L3771) 7 ml ultrapür suda yavaşça çözdürülmüştür. Son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır.

%10 APS: 0,1 g APS 1 ml ultrapür suda çözdürülmüştür.

10x Yürütme (Running) Tamponu (pH~ 8,3):

Tris-base 15,15 g

Glysin 72,05 g

SDS 5 g

Ultra saf su 500 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanmadan önce distile su ile seyreltilmiştir.

Örneklerin Hazırlanması ve Kullanılan Solüsyonlar

-80 °C'de saklanan protein örnekleri kullanılmadan önce 37 °C'de su banyosunda 3 dk.'da çözdürülmüştür. Jele yüklemeden önce 1:1 oranında 2x örnek seyreltme tamponu (Sample buffer) eklenmiştir. 5 dk. 95 °C'de denatüre edilerek 50 µl'lik Hamilton enjektör ile jel kuyucuklarına yüklenmiştir.

2x Örnek Seyreltme Tamponu (Sample Buffer)

Gliserol	2 ml
0,5 M Tris-Hcl pH 6,8	2,5 ml
%0,5 Bromfenolblue	400 µl
% 10 SDS	4 ml
Ultrapür su	1,1 ml
DTT	0,31 g

Örneklerin Yüklenmesi ve Elektroforez

Hazırlanan herbir jele 2 µg markır (Thermo scientific, 84786) ve pozitif kontrol (10 µg) yüklenmiştir. *Galleria mellonella* periviseral yağ doku örnekleri 20 µg total protein olacak şekilde diğer kuyucuklara yüklenmiştir. Yürütme işlemi Mini-Protean Biorad mini elektroforez jel cihazında 100V'de 15dk., 200V'de bir saat olmak üzere toplam 1 saat 15 dk.'da yürütme işlemi son bulmuştur. Güç kaynağı olarak Bio-Rad Powerpac Universal cihazı kullanılmıştır. EcR-B1'in belirlenmesinde pozitif kontrol olarak, proteinin pupal safhanın 9. gününde eksprese olduğu bilinen ipekböceği *Bombyx mori* yağ dokusu kullanılmıştır [108].

Blotting ve Kullanılan Solüsyonlar

Elektroforez sonrasında jel transfer tamponuna alınmıştır. Nitroselüloz membran (Thermo scientific, 77012) ve filtre kâğıdı (Thermo scieentific, PI-88600) jele uygun ölçülerde kesilerek hazırlanan transfer tamponu içerisinde 10 dk. süreyle ıslatılmıştır. Jel membran ve filtre kağıtlarının sandviç içerisine yerleştirilmesinin ardından BioRad jel blotter sistemde, transfer tamponu içerisinde, +4°C'de 400 mA'de 2 saat boyunca transfer gerçekleştirilmiştir. Transferin ardından membran ultrapür suda çalkalanmış ve antijen pretreatment solüsyonu (Thermo scientific, 46640) ile 10 dk. muamele edilmiştir. Ardından 1 saat oda sıcaklığında bloklama solüsyonunda sürekli çalkalanarak bloklama işlemi yapılmıştır. Süre sonunda TBST tamponu ile yıkanan membran primer antibadi seyreltme solüsyonu (Thermo scientific, 4660) ile 1:3500 oranında seyreltilen primer antibadi (Developmental Studies Hybridoma Bank, 6B7, monoklonal) ile +4°C'de gece boyu (16-17 sa.) hafif ve sürekli çalkalanarak inkübe edilmiştir. Membran tekrar TBST ile yıkanarak bloklama solüsyonunda 1:1000 oranında seyreltilmiş horseradish peroksidaz ile konjuge sekonder antibadi (SC-2005) solüsyonunda oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiştir. Ardından TBST ile yıkama

yapılmıştır. Membran 1:1 oranında hazırlanan kemilüminesans substratı (Pierce, ECL Western blotting substrate, 32106) ile 1 dk. muamelenin ardından BioRad ChemiDoc MP System ile görüntülenmiştir. Membranlarda *Bombyx mori*'ye ait örnek referans bant olarak kabul edilerek nispi band yoğunlukları Image Lab (BioRad) yazılımı ile hesaplanmıştır.

Kullanılan Kimyasallar

Tansfer Tamponu: 25 mM Tris (Sigma, T1503), 192 mM Glisin (Merck, 104201) ve %20 metanol ile hazırlanmıştır. Transferden bir gece önce hazırlanarak buzdolabında soğutulmuştur.

TBST: 20 mM Tris Hcl (pH: 7,5), 150 mM NaCl, %0,1 Tween-20 (Sigma, P1379) ile hazırlanmıştır.

Bloklama Tamponu: TBST içerisinde %5 BSA (Sigma, A2153) ile hazırlanmıştır. Koruyucu olarak %0,05 oranında thimerosal (Sigma, T5125) ilave edilmiştir.

3.2.10. Verilerin İstatistiksel Analizi

Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarına ait vücut ağırlıkları, hücre boyutları, total protein miktarı, spesifik asit fosfataz ve spesifik kaspaz 3 enzim aktivitesi verileri, EcR-B1 nispi bant yoğunluklarına ait sayısal verilerin değerlendirilmesi SPSS 20.0 bilgisayar programında yapılmıştır. Değerlendirmede ortalamalar ve standart sapmalar belirlenmiştir. Gruplar arası farklılık One-way ANOVA veya Kruskal Wallis testi ile gruplar arasındaki farklılığın hangi grup/gruplardan kaynaklandığı ise Student-T testi veya Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Tüm sonuçlarda $p < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

Çalışmamızda kullanılan kontrol grubu 7. instar larvaları yaklaşık olarak 3,5 gün (78-84 sa.) beslenmişlerdir. Beslenmeden kesildiği tespit edilen larvaların vücut ağırlıkları tartıldı ve beslenmeden kesildiği bu dönem S1 olarak isimlendirilmiştir. Beslenmeden kesilerek gezinme ve örme davranışı gösteren larvalar, pupal deri değişimine kadar stemmatadan pigmentlerin göç derecesine ve larvaların morfolojik özelliklerine göre S1 ile S5 arasında sınıflandırılması Uwo et al. [75]'a göre yapılmıştır. Beslenmenin kesilmesi ve pupal deri değişimi arasında gerçekleşen larval-pupal metamorfoz 2 ile 3 gün arasında değişmiştir.

Pupal deri değişimini geçiren deney hayvanları 24 saatlik periyotlar esas alınarak safhalara ayrılmıştır. Pupal evre ortalama 7 gün sürmüştür. Kontrol grubu larvalarının tümü normal olarak pupal safhaya geçmiştir (Şekil 4-1a).

4.1.1. Son Larval Evre Üzerine Fenksikarbın Etkileri

Fenoksikarb uygulama dozları için 7. instar 0. gün ve 50 mg'ın üzerindeki 10'ar larvadadan oluşan 8 grup oluşturulmuştur. 50 mg altındaki larvalarla yapılan çalışmalarda kontrol grubu larvalarının bazılarında ekstra larval deri değişimi görülmüştür ve bundan dolayı, 50 mg'nın altındaki larvalar çalışmada kullanılmamıştır.

750 ng ve altındaki denemelerde; 7. instar larvalarının %70 oranında tutarlı olarak ortak yanıt verdiği bir doz tespit edilememiştir. Uygulamalar sırasında görülen değişimler ise şu şekilde özetlenebilir:

- a) %27-47 arasında son larval evrenin 1 ile 2 gün arasında uzaması ve normal pupalaşma,
- b) %10 oranında larval safhanın uzayarak pupalaşmanın gerçekleşmediği kalıcı larva oluştuğu,
- c) beslenememe ve gelişimin geri kalması sonucu zayıf larvaların oranı %5,
- d) karararak ölme %3,

d) 3 ile 7. günler arasında ekstra larval deri değişimi geçirme oranı %35-%65 arasında, ekstra larval evreye geçen larvalarda pupalaşma oranı ise %98 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4-1).

e) 100 ng uygulamasında larval gelişimde herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir.

1 µg/2,5 µl, 2 µg/2,5 µl, 5 µg/2,5 µl ve 10 µg/2,5 µl uygulamaları yapılmıştır. Uygulamalar sırasında görülen değişimler ise şu şekilde özetlenebilir:

a) Yüksek oranda ekstra larval deri değişimi, 3 ile 7. gün arasında meydana gelen ekstra deri değişimi ile larvalar 8. instara geçmişler ve beslenmeye devam etmişlerdir.

b) 1 µg/2,5 µl ve 2 µg/2,5 µl uygulamalarında larvaların 8. instara geçme oranı %95'dir.

c) 5 µg/2,5 µl ve 10 µg/2,5 µl uygulamalarında ise larvalar %3'lük bir sapmayla 8. instara geçmişlerdir.

d) 8. instar sonunda pupalaşma oranı %99 olarak belirlenmiştir.

e) 5 µg uygulama yapılan larvalar 4-6 gün içerisinde %97'lik bir oranda ekstra deri değişimini senkronize bir şekilde geçirdiği ve ilerleyen günlerde dış morfolojisi açısından değerlendirildiğinde sağlıklı görülen pupalar oluşturmuştur (Tablo 4-1).

Bu dört doz arasından senkronize olarak 8. instara geçiş 5. günde (G) %75 oranında gerçekleştiğinden 5 µg/2,5 µl uygulama dozu olarak seçilmiştir.

Tablo 4-1. Fenoksikarbın larvaların gelişimleri üzerine etkisi

Uyg. Dozu	Larval safhada uzama (gün)	Kalıcı larva (%)	Kararma Ölüm (%)	Normal Gelişim (%)	Zayıf gelişim ölüm (%)	Ekstra Larval evre (%)	Ekstra larval evre sonucu pupalaşma (%)
100 ng	-	-	-	100	-	-	-
250 ng	1-2	10	3	47	5	35	98
500 ng	1-2	10	3	40	5	42	98
750 ng	1-2	-	3	27	5	65	98
1 µg	-	-	2	-	3	95	99
2 µg	-	-	2	-	3	95	99
5 µg	-	-	1	-	2	97	99
10 µg	-	-	1	-	2	97	99

Tüm uygulama gruplarında ekstra larval safhaya geçen larvaların %98-99'u pupalaşmıştır. %1-2'lik kısımda anormal gelişimler tespit edilmiştir. Larval-pupal

araform olarak tabir edilen bu anormalilikler sonucu ergin birey gelişimi olmamıştır (Şekil 4-1b).



Şekil 4-1. *Galleria mellonella* pupaları; a) Kontrol grubu pupaları, Sağdaki dişi, soldaki erkek, b) Fenoksikarb uygulamasının ardından 8. instar sonunda görülen anormal dişi pupa (Larval-pupal araform).

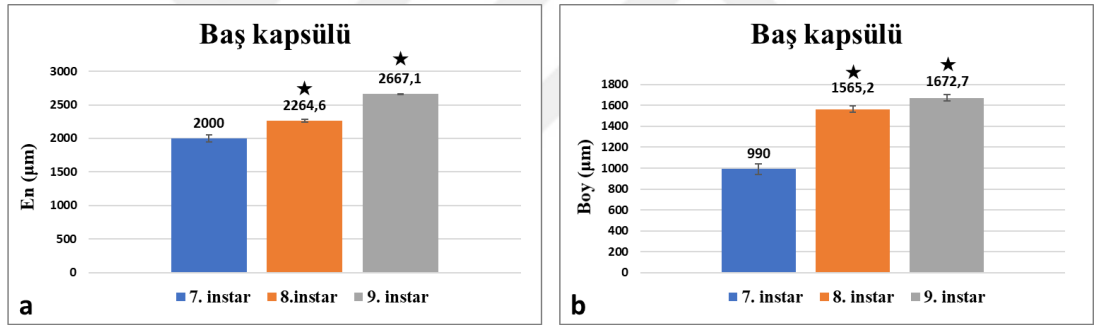
Ekstra deri değiştiren bir kısım larvada ise 9. instara geçiş kaydedilmiştir. Ancak bu larvaların beslenmediği tespit edilmiştir (Şekil 4-2). 9. instara geçen larvalar baş kapsülünü tam olarak atmıştır ancak, derinin parça parça değiştirildiği gözlenmiştir (Şekil 4-3). Fenoksikarb uygulamasının ardından tespit edilen ekstra larval safhalarda (8. ve 9. instar) ve kontrol grubunda (7. instar) baş kapsülü ölçümlerinin ortalama grafikleri Şekil 4-4'te verilmiştir.



Şekil 4-2. Kontrol grubu larvası 7. instar 0. gün ve fenoksikarb uygulamasının ardından görülen ekstra larval safhalarda (8. ve 9. instar) 0. gün larvaları.



Şekil 4-3. Deri değişimini parça parça atarak gerçekleştiren 9. instar larvası.



Şekil 4-4. 7., 8., ve 9. instar 0. gün baş kapsülü a) en, b) boy ölçümleri ortalamaları (n= 10 larva). Barlar ortalama \pm standart hata'yı göstermektedir ★: İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin görüldüğü gelişim dönemleri.

Baş kapsülü ortalamaları SPSS 20,0 One-way ANOVA test istatistiğine göre $p > 0,05$ olduğu için varyansların homojen olduğu %95 güvenle tespit edilmiştir. Student T testi, sonucunda p değerinin 0,05'ten küçük olduğu için iki veri seti (baş kapsülü en ve boy) arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir. Test sonucu elde edilen p değerleri Tablo 4-2'de gösterilmiştir.

Tablo 4-2. Kontrol ve fenoksikarb uygulama grupları baş kapsülü ölçümlerine ait p değerlerini gösteren tablo. *: İstatistiksel olarak anlamlı değişimler.

Baş Kapsülü En		Baş Kapsülü Boy	
Gelişim Dönemi	p değeri	Gelişim Dönemi	p değeri
7-8	0,000*	7-8	0,000*
8-9	0,000*	8-9	0,025*

5 µg fenoksikarb uygulamasının ardından larvalar 4 gün beslenmiş, 5. gün larval deri değişimi geçirmek üzere oldukları gözlemlenmiştir. Baş kapsülleri kaymış, hareketleri yavaşlamış, kendi etrafında yumuşak bir ağ örerek kendilerini ortamdan izole etmişlerdir. Deri değişimine hazırlanan larvalar besin ortamından bir pens yardımıyla alınarak besin içermeyen ayrı bir petriye aktarılmıştır. Deri değişimi tamamlandıktan sonra 20 larva 150 gr besin içeren kavanoza alınarak inkübasyon ortamına bırakılmıştır. Gezinme davranışı gösterene dek 24 saatlik periyotlarda doku örneği alınan larvalardan, pupalaşmanın ardından 24 saatlik periyotlarda yağ doku örneği alınmıştır.

4.1.2. Vücut Ağırlıklarında Görülen Değişimler

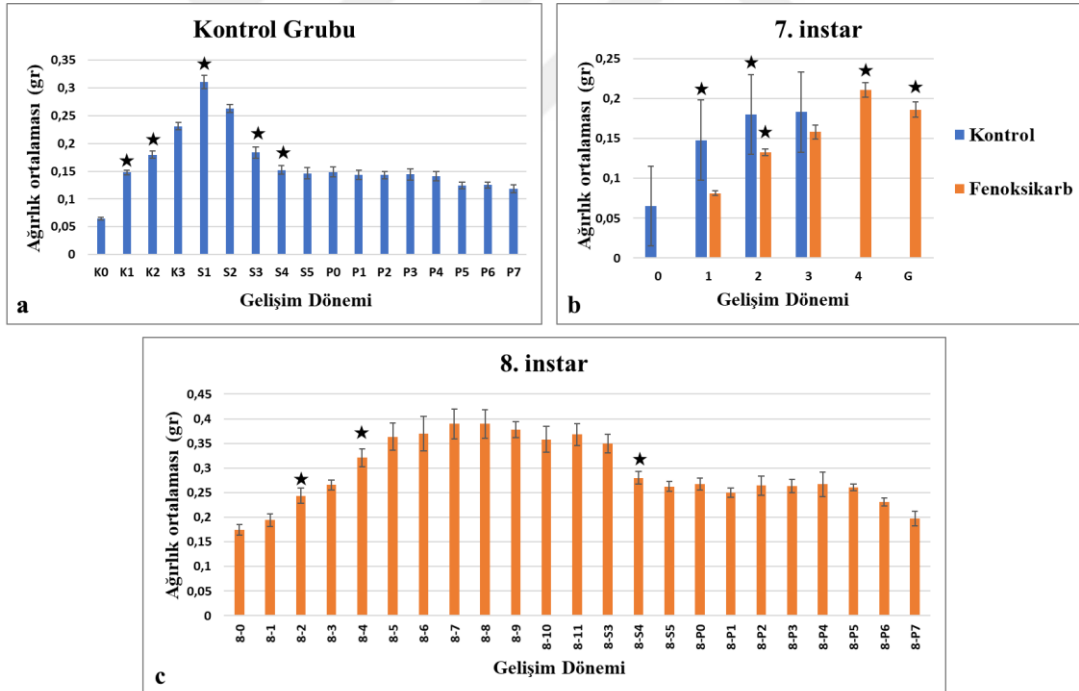
Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu *Galleria mellonella* larva ve pupalarının total vücut ağırlıkları kontrol grubunda 7. instarın 0. gününden pupal safha bitene kadar; uygulama grubunda 7. instar, ekstra larval safhanın (8. instar) 0. gününden pupal safha bitene kadar hassas terazide tartılmıştır. Her gelişim dönemi için en az 10 hayvan kullanılmıştır. Elde edilen günlük ağırlık ortalamaları Şekil 4-5'te verilmiştir. İstatistiksel analizleri gerçekleştirilerek bir önceki güne göre anlamlı değişimin olup olmadığı belirlenmiştir.

Kontrol grubunda bulunan hayvanların total vücut ağırlıklarında 0. günden itibaren beslenme dönemi süresince sürekli artış olduğu bulunmuştur. Gezinme ve örme davranışının başlamasıyla birlikte larval-pupal deri değişimi gerçekleşene kadar ağırlık ortalamalarında kademeli bir düşüş belirlenmiştir. Pupal safhanın sonuna kadar vücut ağırlığında yine kademeli bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 4-5).

5 µg fenoksikarb uygulaması yapılan 7. instarın 0. günü larvaları ilk 4 gün beslenmişler ve total vücut ağırlıklarında düzenli artış gerçekleşmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında vücut ağırlık ortalamalarının daha düşük olduğu tespit

edilmiştir. 5 µg fenoksikarb uygulama grubunun ağırlık ortalamaları kontrol grubundaki tam doymuş larvasından (S1) daha düşük ölçülmüştür. Ağırlık ortalamaları Şekil 4-5b’de gösterilmiştir.

Ekstra larval deri değişimi geçirerek 8. instara geçen larvalar 0. günden itibaren tartılmıştır. Beslendiği dönem süresince ağırlıkları düzenli olarak artmıştır. Larvalar en yüksek ağırlık ortalamasına 8. gün (8-8) ulaşmışlardır. İlerleyen 4 gün süresince (8-8/8-11) larvaların ağırlık ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmediği gibi bağırsak boşalması da gerçekleşmemiştir. 8. instar larvalarının beslenme periyodu, kontrol grubuna göre daha uzun olduğu tespit edilmiştir. 11. günün sonuna doğru gevşek kozalar oluşturmuş olan larvalarda bağırsak boşalmasının meydana gelmesiyle birlikte koza örme davranışı hızlanmıştır (8-S3). 8-S3 ile birlikte ağırlık ortalamaları larval-pupal deri değişimine kadar geçen dönemde düşüş göstermiştir (Şekil 4-5c).



Şekil 4-5. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu larva ve pupalarına ait ağırlık değişimi grafikleri. Barlar ortalama ± standart hata’yı göstermektedir. ★: İstatistiksel olarak anlamlı ağırlık değişimlerinin görüldüğü gelişim dönemleri.

Ekstra larval safha sonunda sağlıklı pupalaşma grlmştir. Pupal safha süresince kontrol grubuna benzer şekilde ağırlık ortalaması sürekli düşüş göstermiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait ağırlık değerlerinin eş gelişim dönemlerinde kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (şekil 4-5).

Ağırlık ortalamaları SPSS 20,0 One-way ANOVA test istatistiğine göre $p < 0,05$ olduğu için varyansların homojen olduğunu savunan yokluk hipotezi %95 güven aralığıyla reddedilmiş, Kruskal-Wallis sıralamalı tek-yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Her iki grupta da istatistiksel olarak günlere göre ağırlık değişimlerinde anlamlı farklılık vardır. Bu farkın/ farkların hangi gün/günlerde olduğunu belirlemek amacıyla grup medyanlarını ikili olarak karşılaştıran Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Mann-Whitney U testine göre her günün ağırlık medyanı bir önceki gün ile karşılaştırılmıştır. p değerleri $< 0,05$ olması önceki güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olduğunu göstermiştir. Test değerleri sonuçları Tablo 4-3'de özetlenmiştir.

Tablo 4-3. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarının ağırlık değişimlerine ait p değerleri çizelgesi. *: İstatistiksel olarak anlamlı ağırlık değişimlerinin görüldüğü gelişim dönemleri.

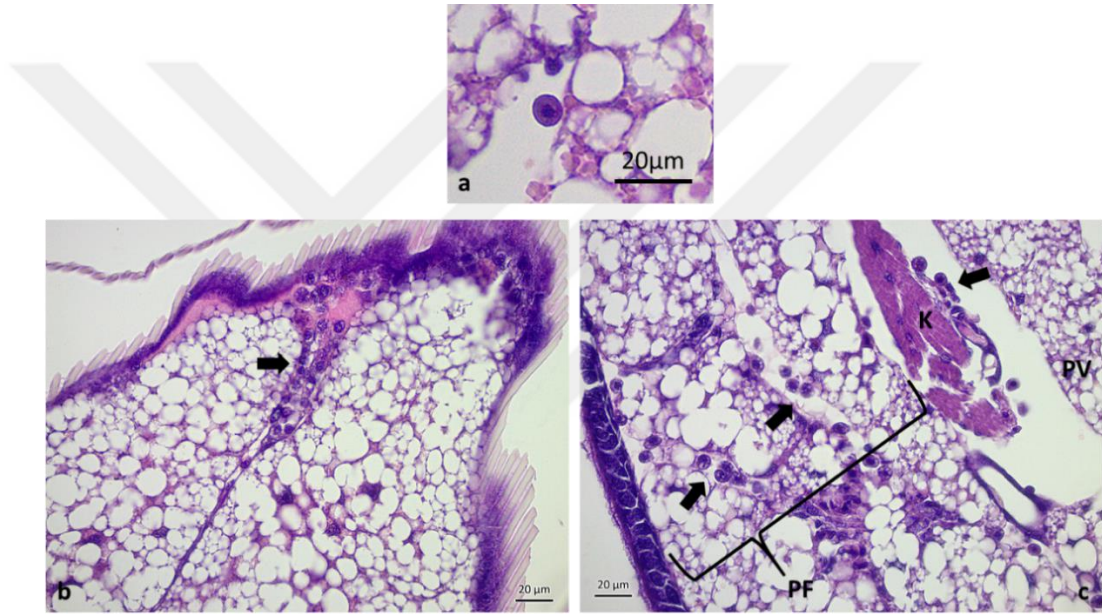
GD	p değerleri	GD	p değerleri	GD	p değerleri	GD	p değerleri	GD	p değerleri
0-1	0,000*	S5-P0	0,393	D1-D2	0,000*	8-4/8-5	0,247	8S4/8S5	0,247
1-2	0,000*	P0-P1	0,579	D2-D3	0,143	8-5/8-6	0,353	8S5/8P0	0,853
2-3	0,912	P1-P2	0,739	D3-D4	0,003*	8-6/8-7	0,739	8P0/8P1	0,247
3-S1	0,015*	P2-P3	0,971	D4-G	0,052*	8-7/8-8	0,853	8P1/8P2	0,481
S1-S2	0,971	P3-P4	0,739	G-8-0	0,796	8-8/8-9	0,971	8P2/8P3	0,971
S2-S3	0,005*	P4-P5	0,075	8-0/8-1	0,218	8-9/8-10	0,739	8P3/8P4	0,684
S3-S4	0,004*	P5-P6	0,529	8-1/8-2	0,023*	8-10/8-11	0,853	8P4/8P5	0,481
S4-S5	0,247	P6-P7	0,579	8-2/8-3	0,218	8-11/8S3	0,631	8P5/8P6	0,019
				8-3/8-4	0,019*	8S3/8S4	0,011*	8P6/8P7	0,063

4.1.3. Histolojik ve Sitolojik Bulgular

Galleria mellonella larvalarında yağ dokusu beyazımtrak, süngerimsi bir kütle görünümündedir. Larval dönemde trake, trakeoller ve ilişkili bulunduğu organlarca desteklenir ve amorf bir doku morfolojisi sergiler. Pupal dönemde ise hemosl içinde hemolenf ile süspanse halde hücre kümeleri halinde bulunur. Periferik ve periviskeral yağ doku buldukları lokalite itibarıyla ve histokimyasal özelliklerine göre boyanma

farklılıklarıyla birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Periferel yağ doku integument ile kas tabakası arasında uzanmakta olup periviserel yağ doku sindirim kanalının etrafını saran, organların içine gömülü halde büyük bir kütle olarak bulunmaktadır (Şekil 4-6c). Özellikle pupal safhada tüm canlı vücudunda en çok yer kaplayan doku haline gelir (Şekil 4-7).

Çalışmamızda, *Galleria mellonella* yağ dokusunda trofosit ve önosit olmak üzere iki farklı tip yağ doku hücresi gözlenmiştir. Sıklıkla rastlanılan hücre tipi trofositlerdir. Önositler ise trofosit hücreleri arasında kümeler halinde bulunmaktadır (Şekil 4-6b, c).



Şekil 4-6. Larval evrede önositler; a) Önosit, b) Trofositlerin oluşturduğu loblar arasında önositler, c) Periferel yağ dokunun yerleşimi.



Şekil 4-7. Pupanın abdominal bölgesi enine kesiti, HE boyama.

Önositler trofositlere göre daha küçük hücrelerdir. Yuvarlak ve elips şekillerde rastlanmaktadır. Bazı bölgelerde komşu hücrelerin baskısıyla şekillerinin hafif deforme olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-6c). Sitoplazmaları hem hematoxilen ile hem de eozin ile güçlü boyanmıştır (Şekil 4-6a-c). Önositlerin, trofositler arasında sıklıkla bir arada görüldüğü özel bölgeler vardır. Özellikle dokunun periferinde ve kutikula yakın bölgelerde, periferik yağ doku hücrelerinin arasında ve hemen altında kas doku ile sınırında, kas dokunun çevresinde ve trakelerin etrafındaki bölgelerde, perivisceral yağ dokunun oluşturduğu loblar arasında kümeler halinde daha bol bulunmaktadır (Şekil 4-6a-c). Trofositlerin oluşturduğu loblar arasında kümeler halinde önosit hücrelerine 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda da rastlanmıştır.

Trofositler yağ dokuda en yaygın bulunan hücre tipleridir. Nükleusları merkezidir, larval safhanın ilk günlerinde yuvarlak ve yuvarlağa yakın morfolojiye sahipken (Şekil 4-8c; 4-9a-b; 4-10b; 4-12c; 4-20a, b), ilerleyen günlerde sitoplazmalarında birikim gösteren materyallerin oluşturduğu baskıyla düzensiz şekillerde görülmektedir (Şekil 4-12e, 4-17b). Yağ doku hücrelerinin morfolojik gelişimi ve değişimi ışık mikroskobunun yanı sıra elektron mikroskobu tekniğiyle de

araştırılmıştır. İnce yapı incelemelerde trofosit hücrelerinin membranlarında yüzey alanını genişleten kıvrımlar görülmektedir (Şekil 4-8b, c). Nükleusları tüm gelişim dönemlerinde heterokromatin bölgelere sahip olup bölünme özelliği sergilememektedir (Şekil 4- 9b).

Trofositlerin sitoplazmalarında yoğun boyanma özelliği sergileyen küresel yapılar, lipid vakuolleri ve bazı eozinofilik granüller görülmüştür. Bu yapılar sitolojik incelemelerde elektronca yoğun yapılar olarak görülmektedir (Şekil 4-9a, b; 4-11f). Larval safhanın ilk günlerinde bazofilik karakter sergileyen sitoplazma içerisinde, yağ birikimi olduğu düşünülen küçük vakuol yapıları bulunmaktadır (Şekil 4-10b). İlerleyen günlerde sitoplazma granül ve depo maddeleri inklüzyon birikimi bakımından artış göstermekte, sitoplazmik alanlar eozinofilik karakter sergilemektedir (Şekil 4-10h). Yağ vakuolleri ise boyut olarak artış göstermiştir (Şekil 4-11c).

Trofositler fonksiyonlarının gereği olarak sitoplazmalarında birikimi artan materyaller nedeniyle pupal safhanın 2. günü itibariyle özellikle 3. ve 4. günlerde hücre sınırlarının belirginliğini kaybetmektedir (Şekil 4-15e, f; 4-16 a, b; 4-18 a-e). Ayrıca, trofositleri bir arada tutan ve lobların bütünlüğünü koruyan bazal membranın da bozulmasıyla hücreler hemolenfte süspanse hale geçerek dokunun diseksiyonda pens ile alınması, ilerleyen aşamalarda histolojik preparasyon işlemlerine tabi tutulması son derece zorlaşmaktadır.

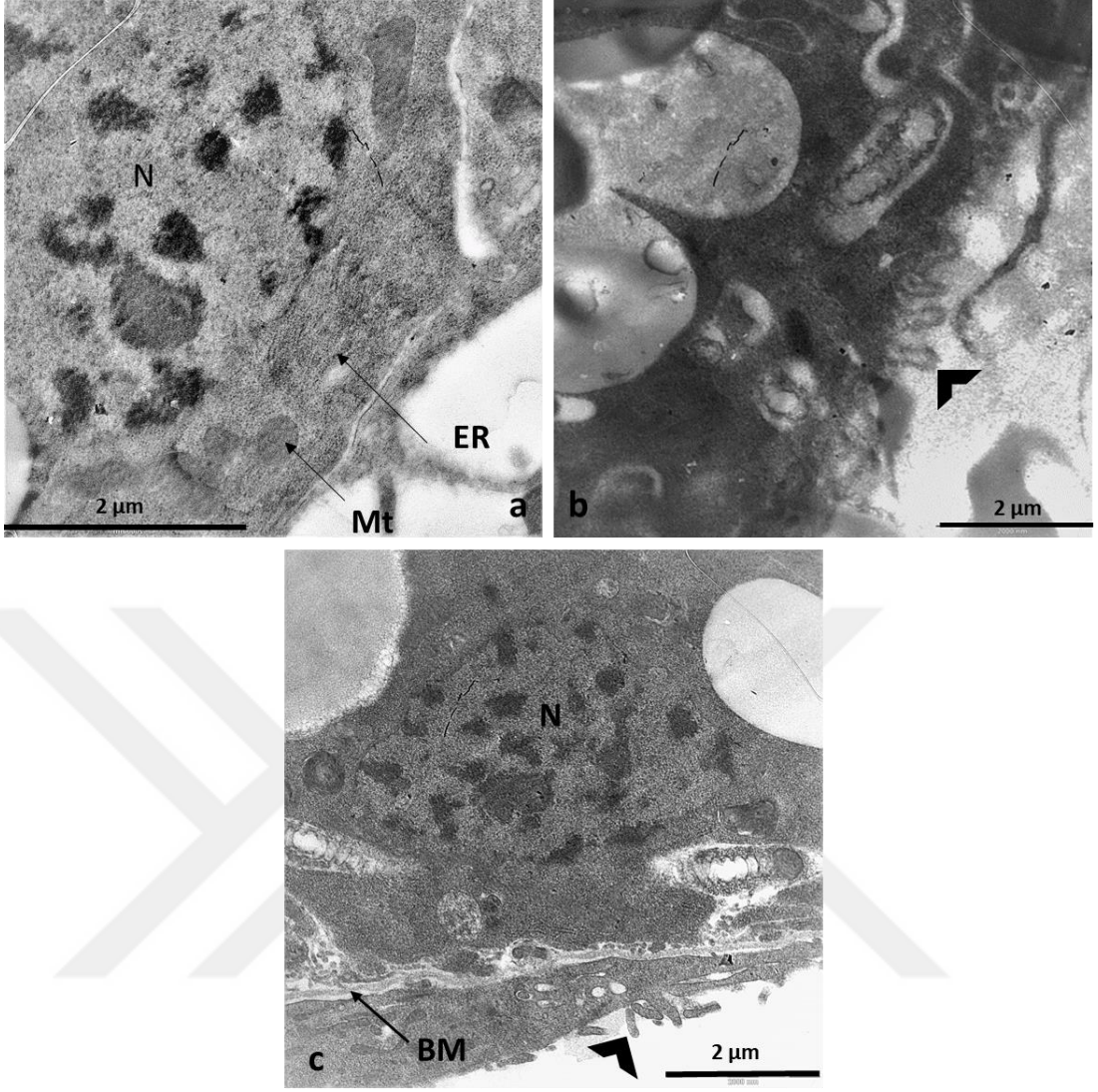
Genel anlamda birbirleri ile temas halinde olmayan periferik ve periviserik trofositlerin bazı bölgelerde birbirleriyle temas halinde bulunabildiği görülmüştür. Larval safhanın ilk günlerinde periviserik yağ dokunun bazofilik karakterde olduğu; periferik yağ doku hücrelerinin ise eozinofilik karakter serilediği tespit edilmiştir (Şekil 4-11 b, c; 4-7 d).

Trofositlerin sitoplazmalarında eozinofilik vakuollere kontrol grubunda özellikle örme davranışının gözlemlendiği S3'te rastlanmıştır (Şekil 4-12a). Bugünden itibaren pupal safhanın ortalarına kadar artış gösteren granüller ergin deri değişimine yaklaşırken önemli ölçüde azalmaktadır (Şekil 4-19e). 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda eozinofilik karakterdeki bu granüllere 8. güne kadar rastlanmamıştır (4-11 a-e; 4-13 a-h). 8. gün belirlenen eozinofilik inklüzyon birikimi 4 gün süresince (Şekil

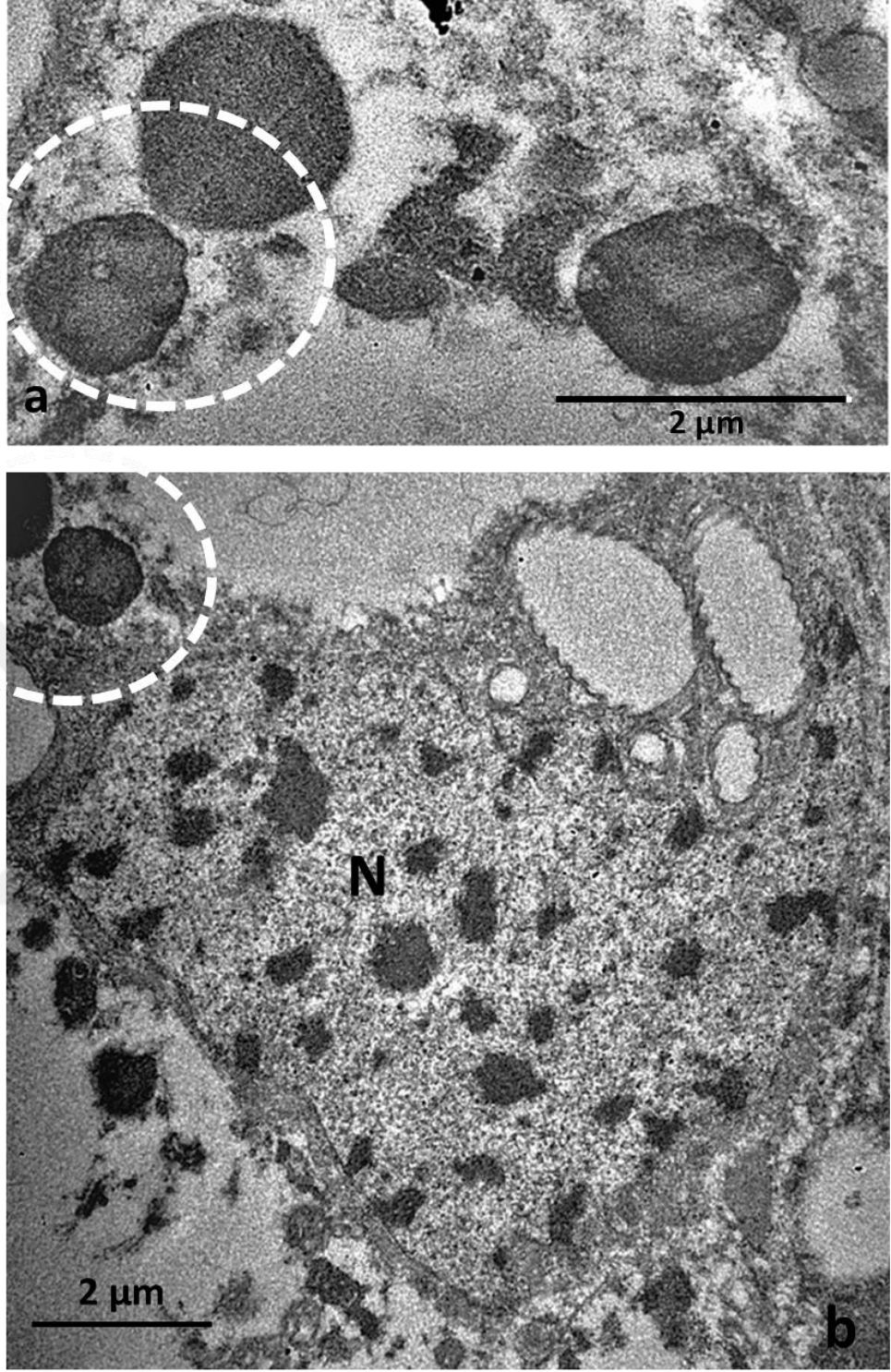
4-14 a-d) artış göstermemiş, 8-S3'te yoğunluğu birden artış göstermiştir (Şekil 4-12 b).

Çalışmamızda transmisyon elektron mikroskobu, trofositlerde meydana gelen otofajinin indikatörü olan otofagozom ve otolizozom yapılarını tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. TEM ince yapı bulgularına göre homojen ve heterojen yapıda elektronca yoğun granüllerin larval evrede sitoplazmik alanda daha az olduğu belirlenirken, pupal evreye geçiş ile birlikte sayıları da artış göstermiştir (Şekil 4-10e, f; 4-15c, d). Pupal evrede sitoplazmik bölgede heterojen görünümlü çift membranlı otofajik vakuol ve tek membranlı otolizozom gibi vakuoler yapıya rastlanmıştır (Şekil 4-16c; 4-17a-d; 4-20c-d). Pupal safhanın ilerlemesiyle birlikte içerisinde elektronca az yoğun bölgelere sahip otolizozom yapılar sayıca artmıştır (Şekil 4-19c; 4-20). Hem kontrol hem de 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda özellikle pupal evrenin 3. gününde görüntüleme yapılan alanlarda fagofor yapıları, lizozomlar ile birleşen otofagozom yapıları tespit edilmiştir (Şekil 4-17; 4-18). Otolizozomlarda elektronca açık ve koyu bölgelere sahip ve heterojen görünümün nedeni olan yapıların lipofuksin pigmenti olduğu belirlenmiştir (Şekil 4-16c, d). Otolizozom yapılarının 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda daha çok olduğu görülmüştür (Şekil 4-21). Ayrıca, gezinme ve örme dönemine ait kesitlerde sitoplazmik bölgelerde zar katlanmalarına benzer yapılar belirlenmiştir (Şekil 4-12d).

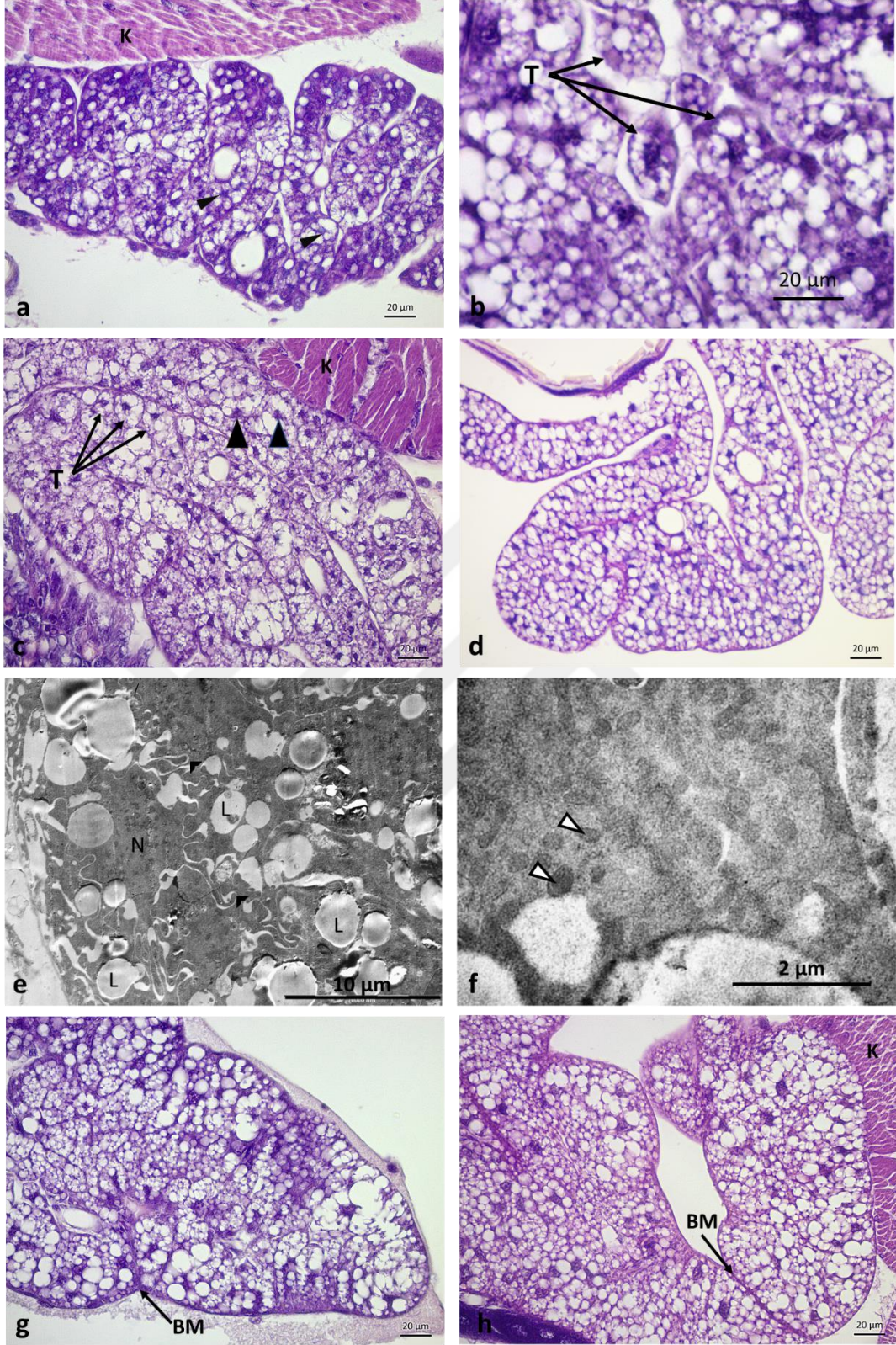
Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarında görüntülenen hücre nükleuslarının ince yapıları heterokromatin bölgelere sahip olup apoptotik hücre ölümüne spesifik nükleus morfolojisine sahip olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4-8a; 4-9 b; 4-10 e; 4-11f; 4-15d; 4-19c; 4-20a, b).



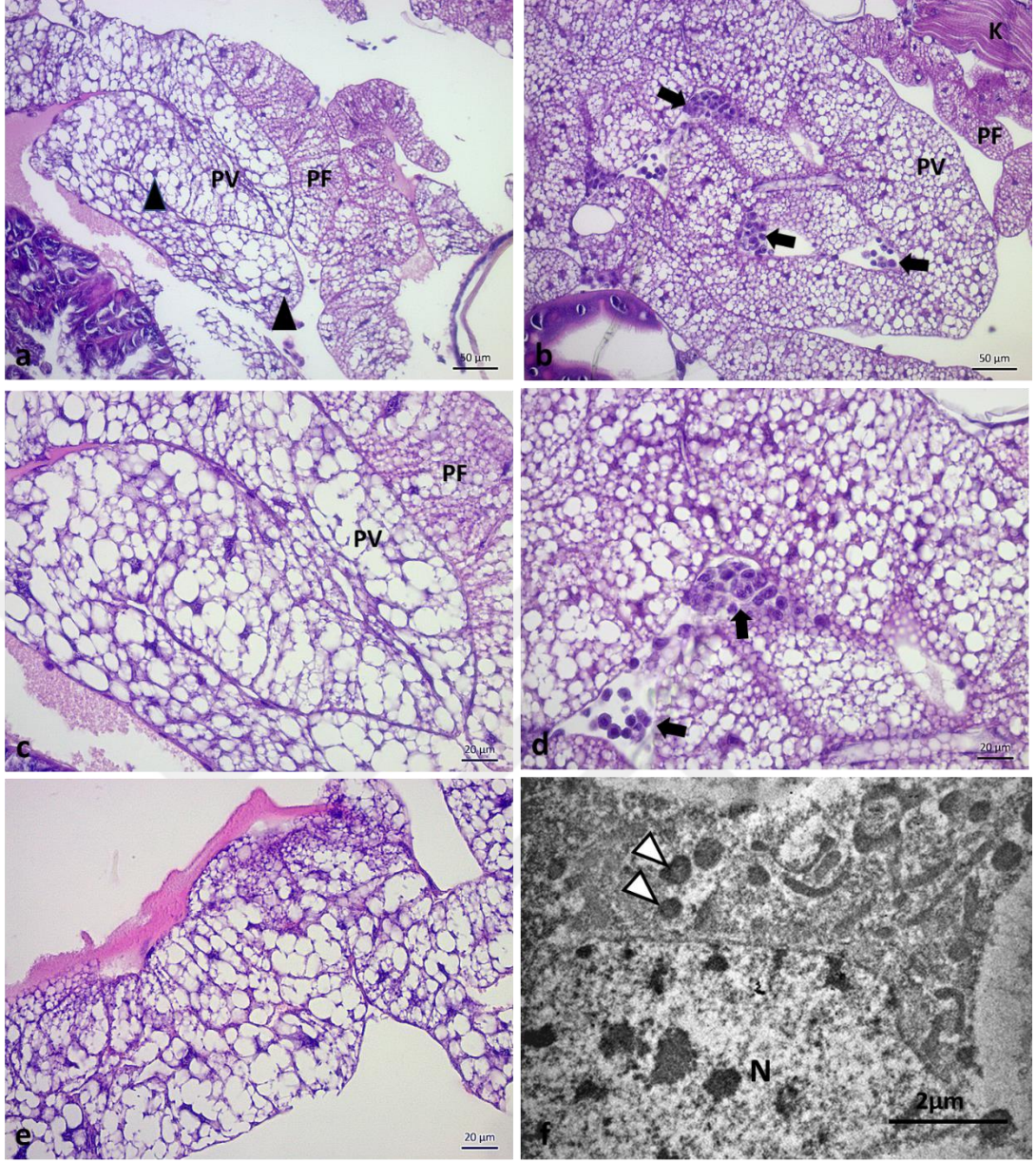
Şekil 4-8. *Galleria mellonella* larvası trofosit hücresinde ince yapı; a) Nükleus, b) Memranda sitoplamik uzantılar, c) Bazal membran.



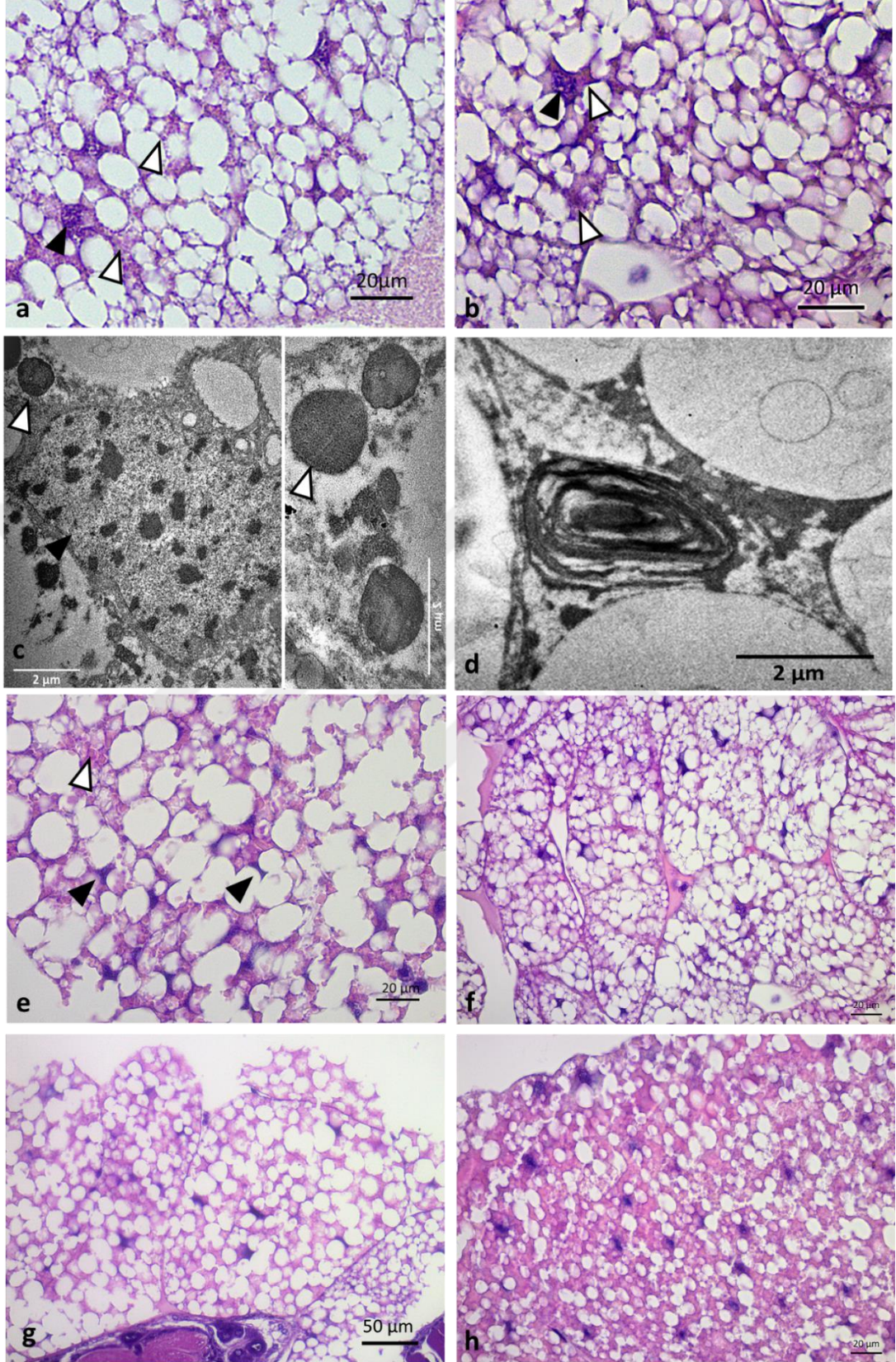
Şekil 4-9. *Galleria mellonella* larvası trofosit hücresi; a) Elektronca yoğun granüller, b) Nükleus.



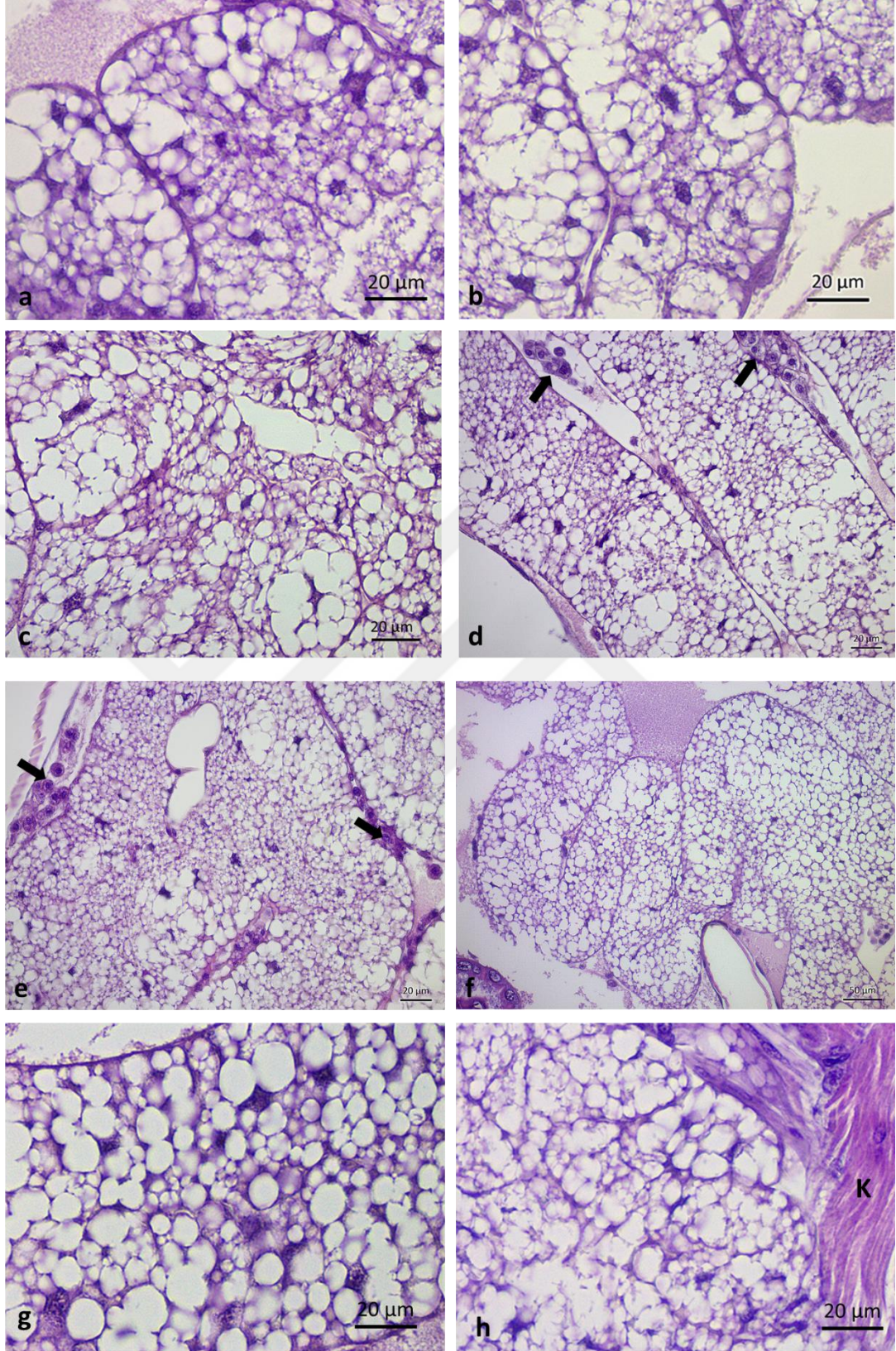
Şekil 4-10. Larval evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) K0, b) K2, c) K1, d) D1, e) K1 (TEM), f) D1 (TEM), g) K2, h) D2.



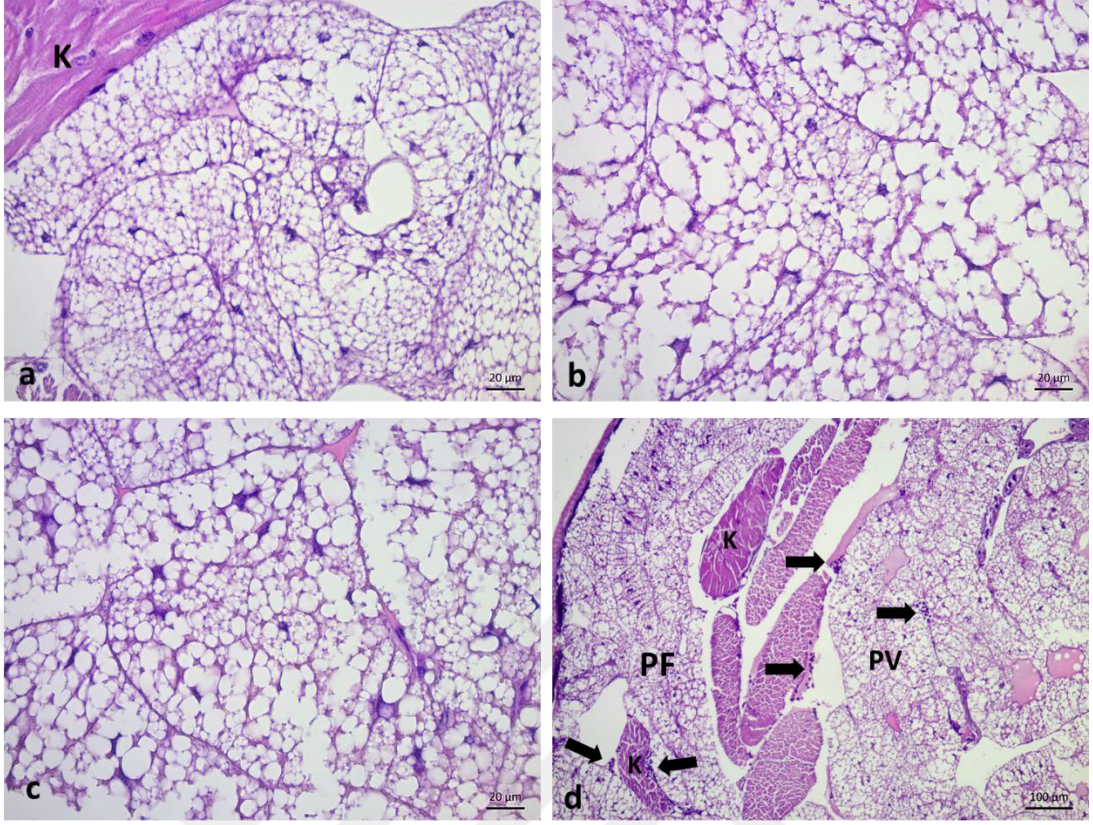
Şekil 4-11. Larval evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) K3, b) D3, c) S1, d) D4, e) S2, f) G (TEM).



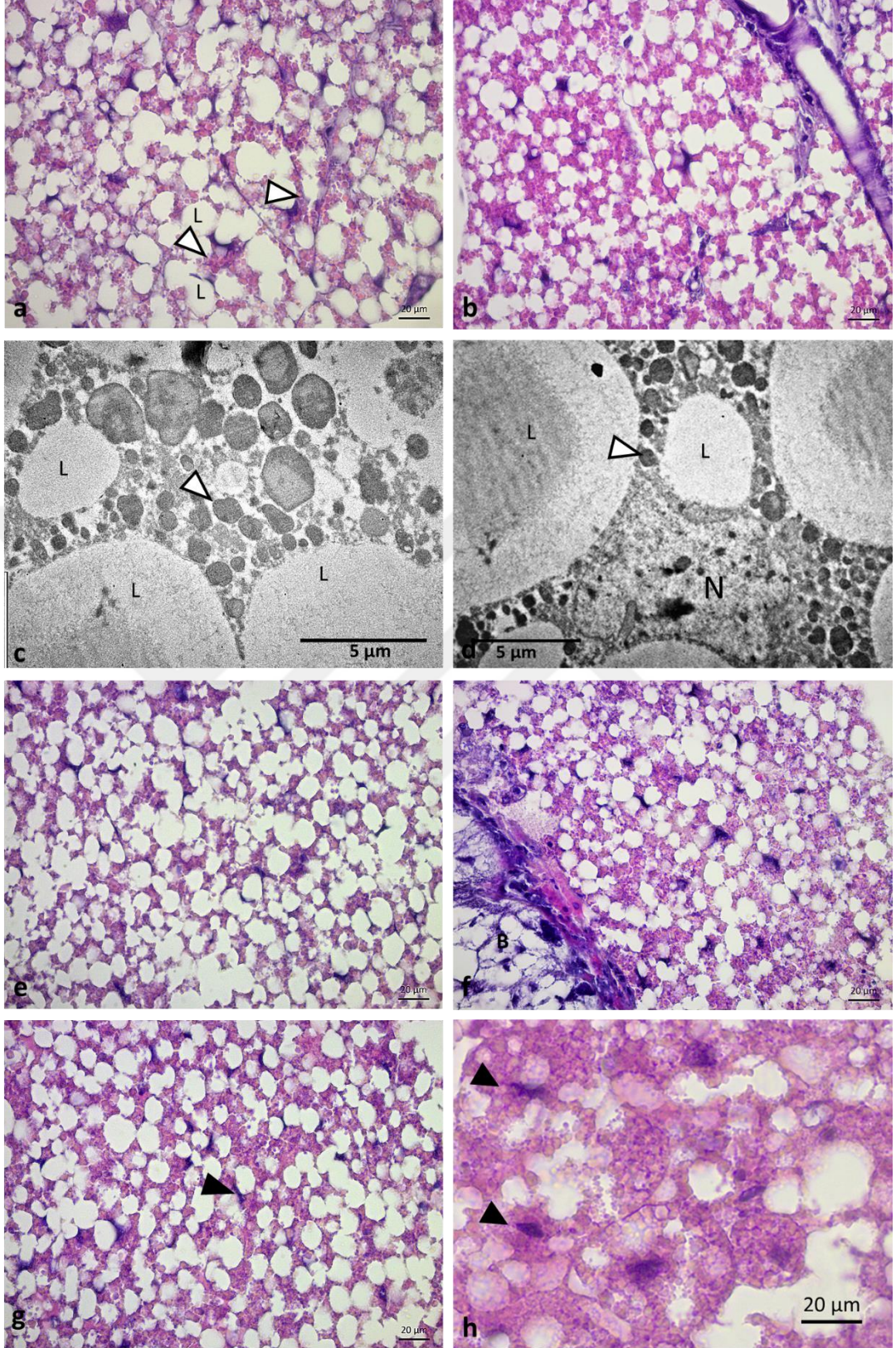
Şekil 4-12. Larval evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) S3, b) 8-S3, c) S3 (TEM), d) 8-S3 (TEM), e) S4, f) 8-S4, g) S5, h) 8-S5.



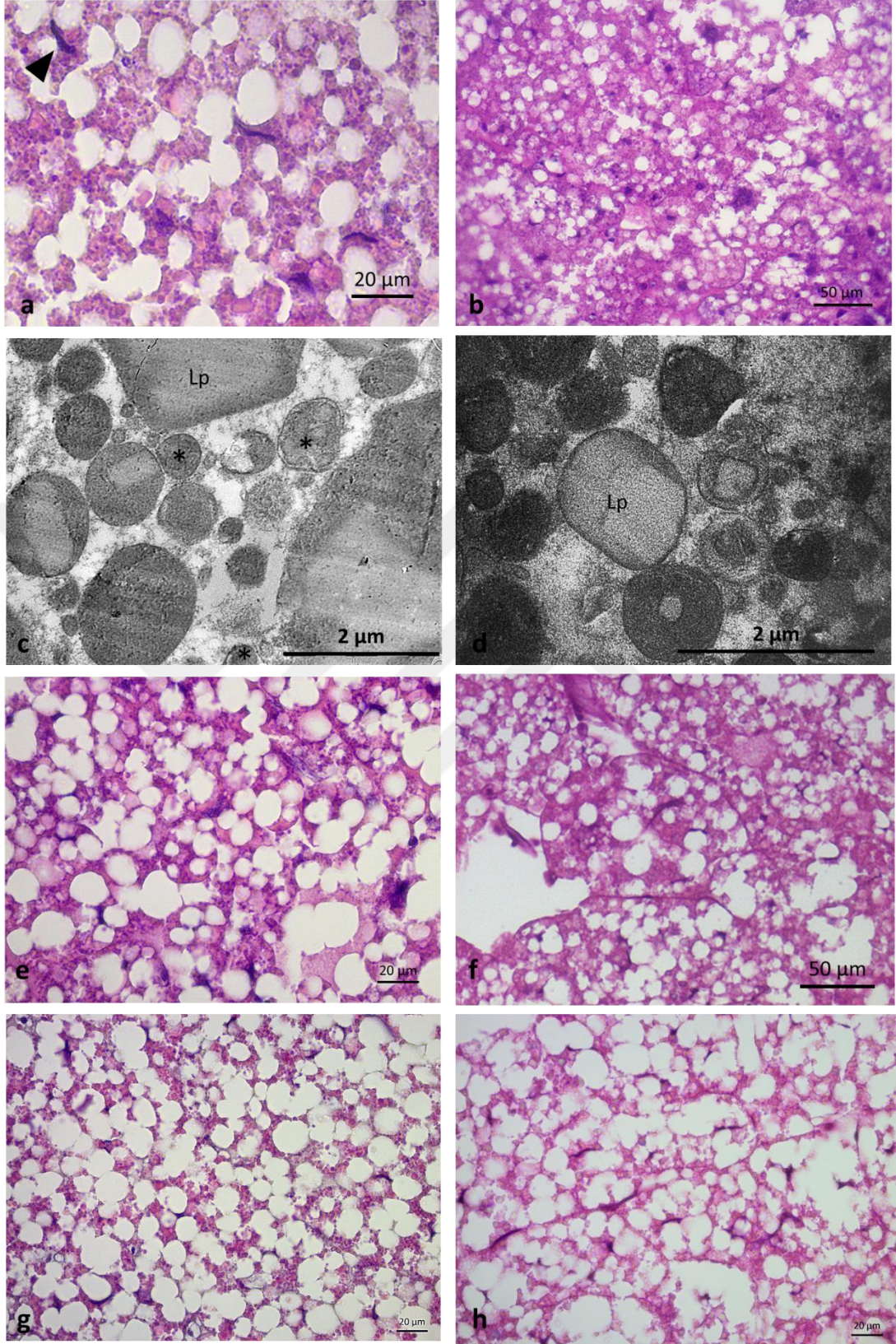
Şekil 4-13. Ekstra larval evre (8. instar) trofositlerinin histolojik (HE) görüntüleri; a) 8-0, b) 8-1, c) 8-2, d) 8-3, e) 8-4, f) 8-5, g) 8-6, h) 8-7.



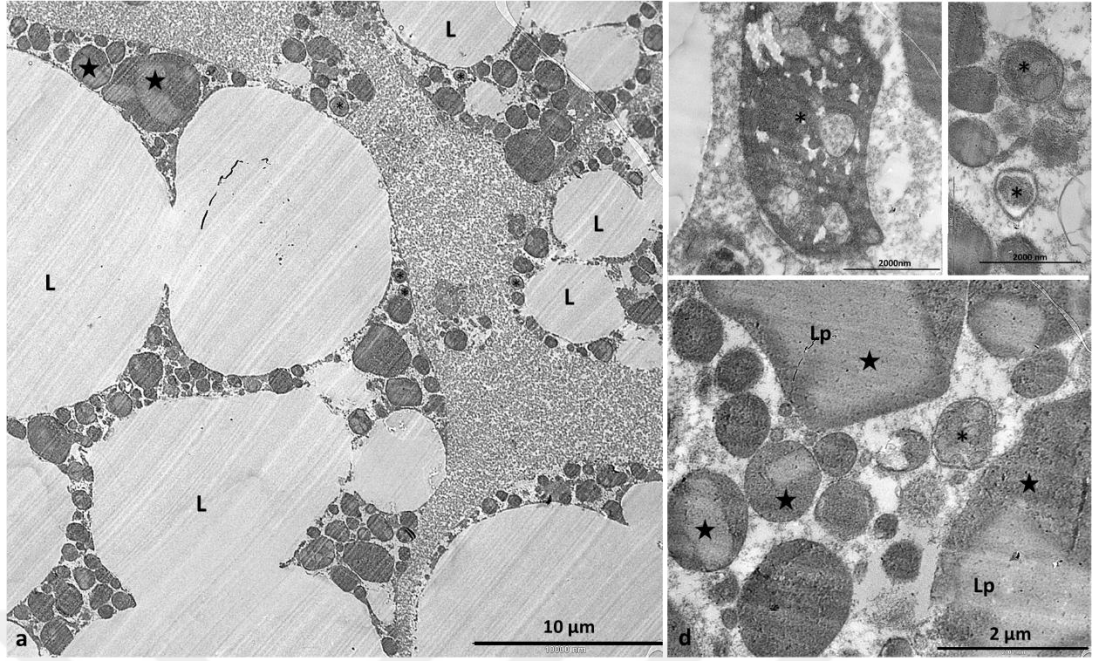
Şekil 4-14. Ekstra larval evre (8. instar) trofositlerinin histolojik (HE) görüntüleri; a) 8-8, b) 8-9, c) 8-10, d) 8-11.



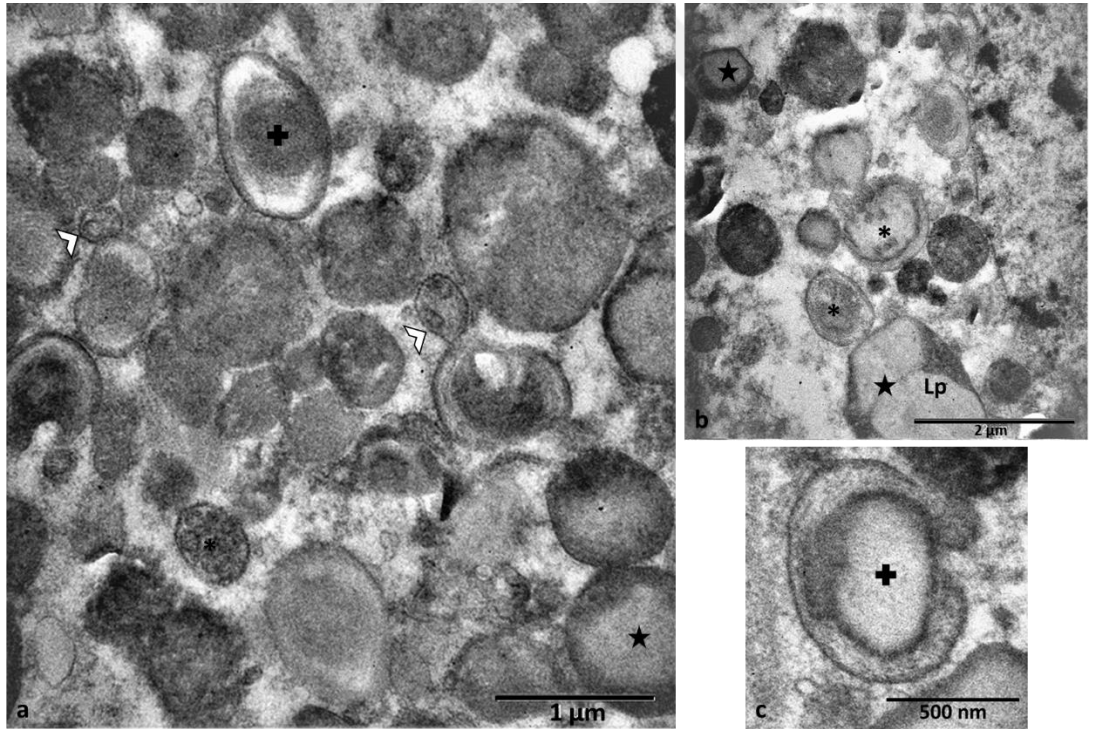
Şekil 4-15. Pupal evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) P0, b) 8-P0, c) P0 (TEM), d) 8-P0 (TEM), e) P1, f) 8-P1, g) P2, h) 8-P2.



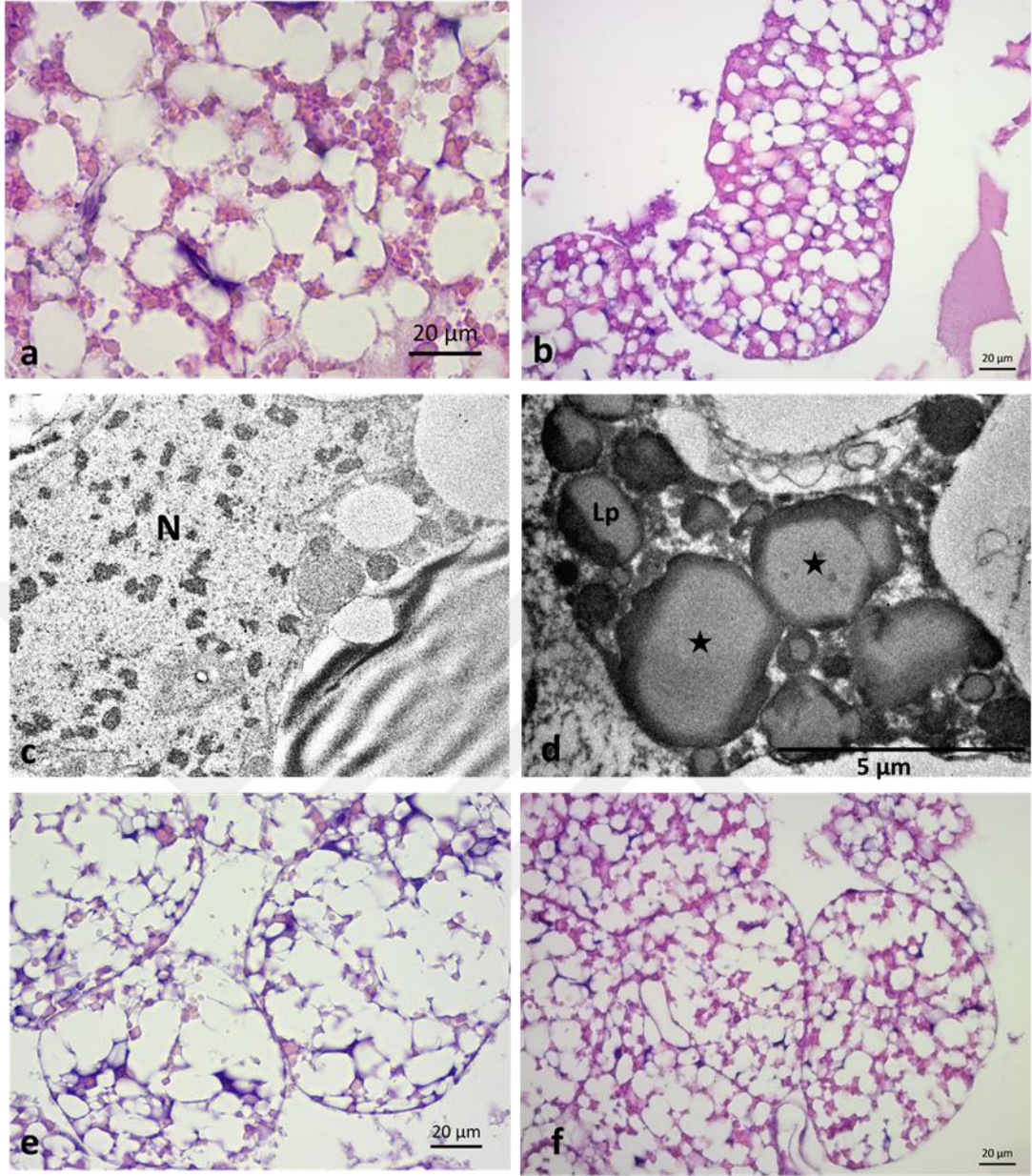
Şekil 4-16. Pupal evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) P3, b) 8-P3, c) P3 (TEM), d) 8-P3 (TEM), e) P4, f) 8-P4, g) P5, h) 8-P5.



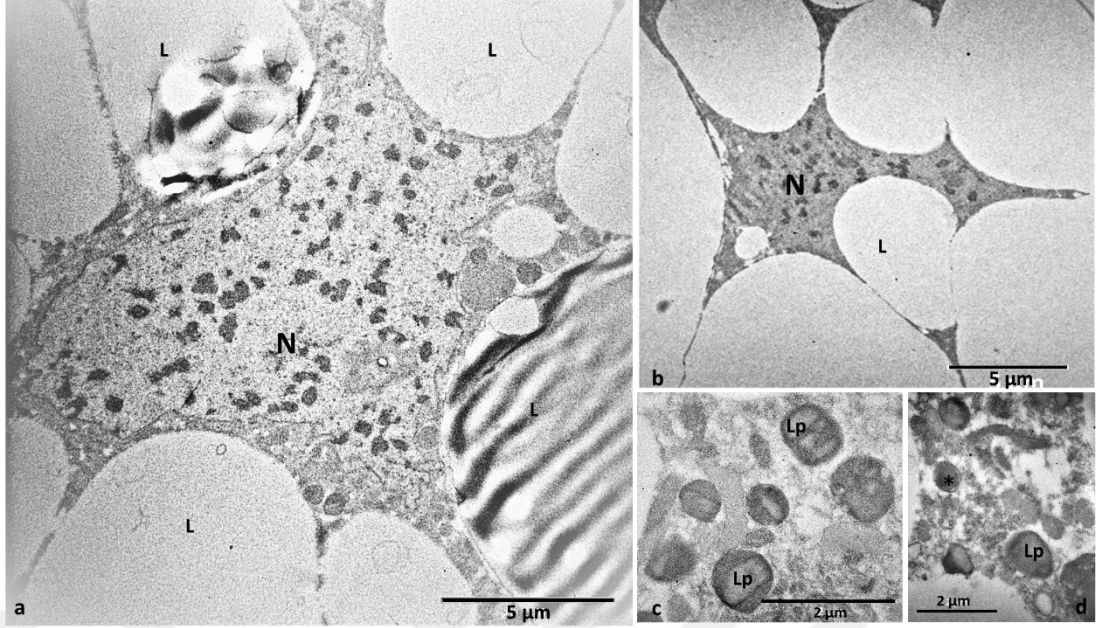
Şekil 4-17. Kontrol grubuna ait pupal evrenin 3. günü (P3) trofositlerin ince yapısı; a-d) Yakın plan sitosölik alanlar.



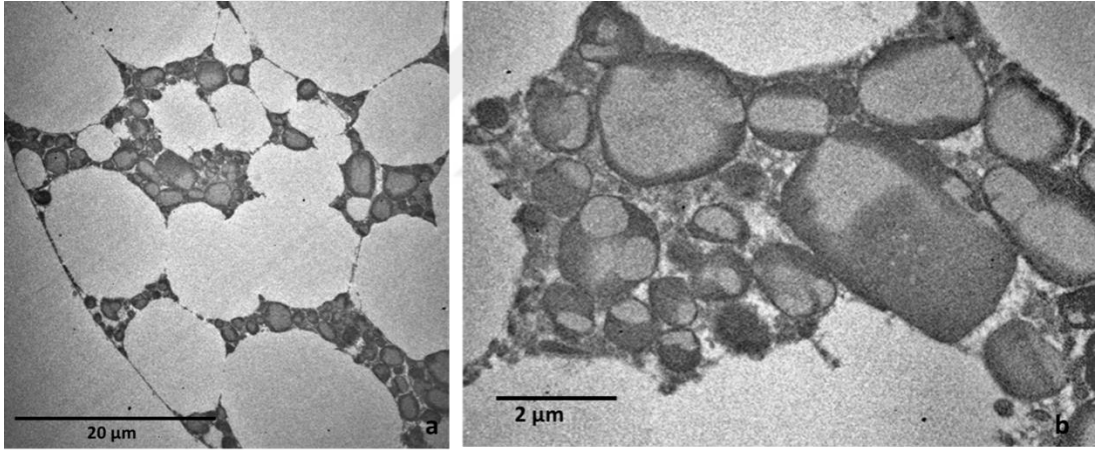
Şekil 4-18. 5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait pupal evrenin 3. günü (8-P3) trofositlerin ince yapısı; a, b) Sitosölik alanlar, c) Fagofor.



Şekil 4-19. Pupal evredeki trofositlerin histolojik (HE) ve ince yapı görüntüleri; a) P6, b) 8-P6, c) P6 (TEM), d) 8-P6 (TEM), e) P7, f) 8-P7.



Şekil 4-20. Kontrol grubuna ait pupal evrenin 6. günü (P6) trofositlerin ince yapısı; a, b) Nükleus, c, d) Yakın plan sitosölik alanlar.



Şekil 4-21. 5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait pupal evrenin 6. günü (8-P6) trofositlerin ince yapısı; a, b) Sitosölik alanlarda bulunan otolizozomlar.

Çalışmamızda PAS boyama, periviseral yağ dokudaki trofosit hücrelerinin oluşturduğu lobları kuşatan bazal membran yapısının yıkımı hakkında bilgi edinmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Trofositlerde polisakkaritlerin (glikojen) birikimi konusunda elde edilen bulgular da özetlenmiştir. Pozitif kontrol olarak bağırsak dokusu kullanılmıştır (Şekil 4-22b).

Yağ doku hücrelerinin meydana getirdiği loplara bir bazal membran tarafından kuşatılmaktadır. Bu membran bir yandan organ ile hemolenf arasında metabolit

değişiminde aktif görev üstlenirken diğer yandan dokuyu uygun olmayan koşullardan korumaktadır. Bazal membranın kalınlığı böceğin gelişim dönemlerinde değişim göstermektedir [103]. Larval safhanın başlarından itibaren pupal safhanın özellikle 2. gününe (P2) kadar yağ doku hücrelerini bir arada tutan ve lobüler bir yapı kazandıran bazal membranın trofositler arasında varlığı ve bütünlüğü PAS boyamada açıkça görülebilmektedir (Şekil 4-22; 4-23; 4-24). Pupal safhanın 2. gününden (P2) itibaren bazal membran bütünlüğünün yer yer bozulduğu, pupanın 3. (Şekil 4-24g; 4-25a) ve 6. günleri (P6) arasında bazal membran belirlenmemiştir (Şekil 4-25g). Pupal safhanın 2. gününden itibaren sitoplazmada artan materyal birikimi nedeniyle hücre sınırları da tespit edilememiştir (Şekil 4-25a, c, e).

5 µg fenoksikarb uygulama grubunda larval safhanın tüm aşamalarında bazal membran bütünlüğünü korumaktadır (Şekil 4-22; 4-23; 4-24b; 4-27; 4-28). Pupal safhaya geçilmesiyle birlikte özellikle 2. gün (8-P2) yer yer bütünlüğünün bozulduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-24h). Kontrol grubu ile benzer şekilde pupanın 3. ve 4. gününde ise yapısının tamamen bozulması nedeniyle kesitlerde bazal membran tespit edilememiştir (Şekil 4-25b, d). Kontrol grubu ile benzer şekilde bazal membran 6. gün (8-P6) tekrar oluşmuştur (Şekil 4-25h).

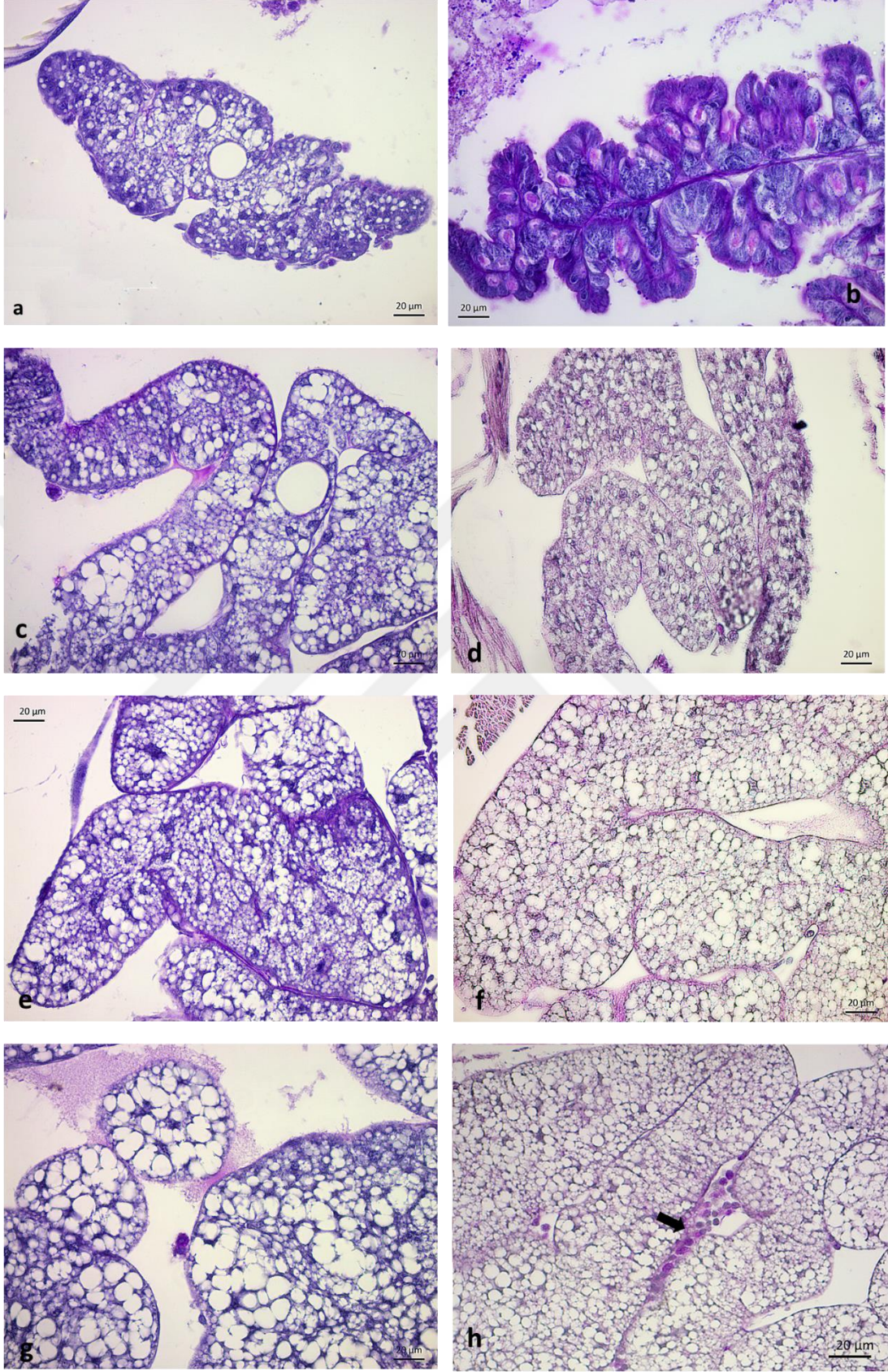
PAS boyamada larval safhanın ilk günlerinde, içerdiği karbonhidrat bakımından periferik yağ dokunun daha yoğun boyanmıştır (Şekil 4-23a, b). Önositler, PAS pozitif reaksiyon göstermiştir (Şekil 4-22h).

Kontrol grubunda 7. instarın 0. gününden örme davranışının gözlemlendiği güne kadar yoğun glikojen birikimi gözlenmemiştir (Şekil 4-22a, c, e, g; 4-23a, c). Özellikle gezinme ve örme davranışının başlamasıyla birlikte trofosit hücrelerinin sitoplazmasında, nükleus etrafında yoğunlaşan glikojen granülleri belirlenmiştir (Şekil 4-23e). Birikimin pupal safhanın 3. ve 4. günü en üst seviyeye ulaştığı, 5. gün itibarıyla azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4-25a, c, e). Ergin deri değişimine yaklaşıldığında PAS boyanmanın önemli bir şekilde azaldığı ve glikojen depolarının tükendiği görülmüştür (Şekil 4-26a).

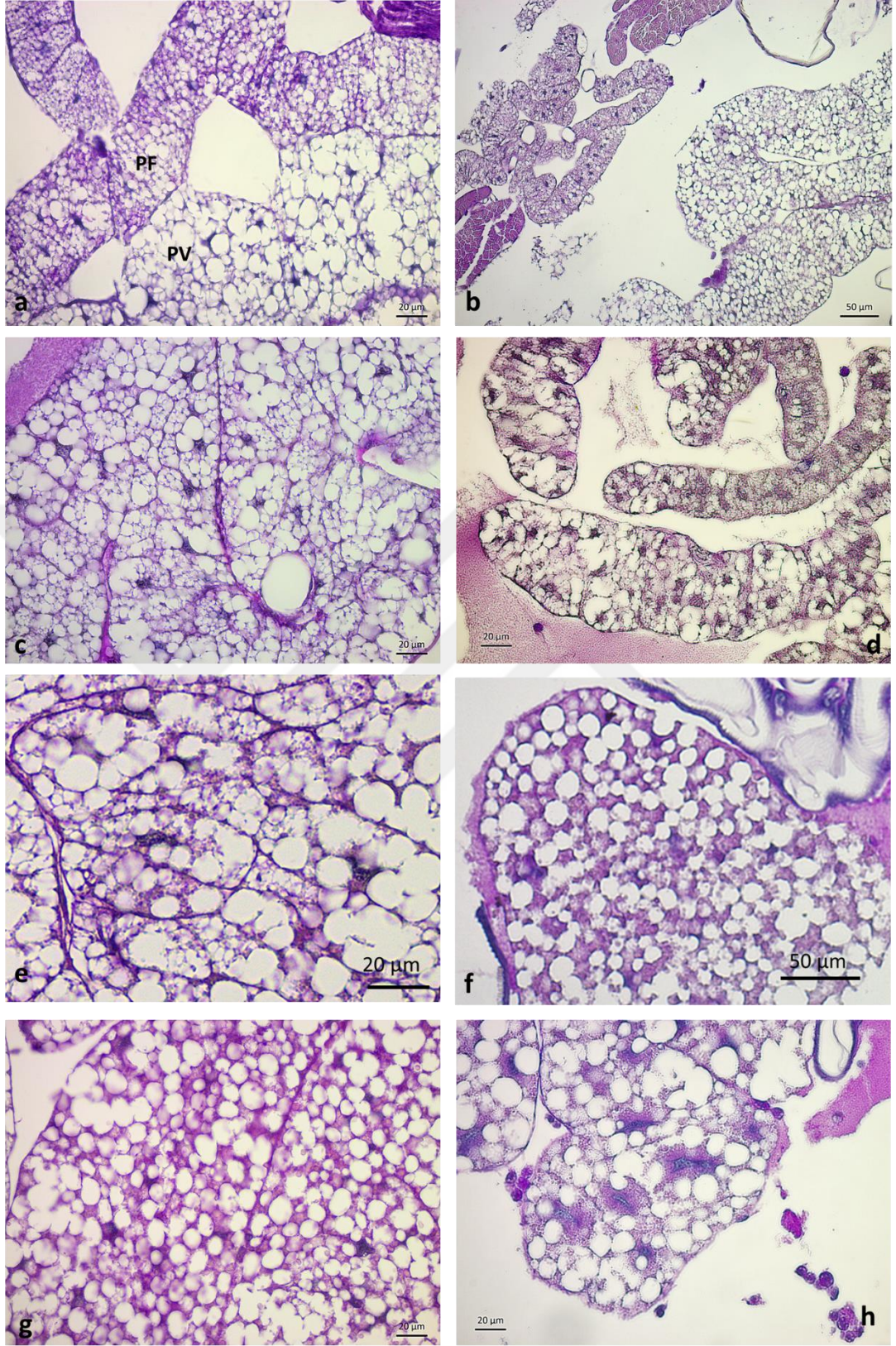
Pupal deri değişiminin ardından kontrol grubu ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda yoğun PAS pozitif reaksiyon veren kesitler 4. gün en yoğun boyanma

özelliği göstermiştir (Şekil 4-25c, d), 5. gün azalmaya başlayan yoğunluk her iki grupta da 7. gün en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4-25e, f; 4-26a, b).

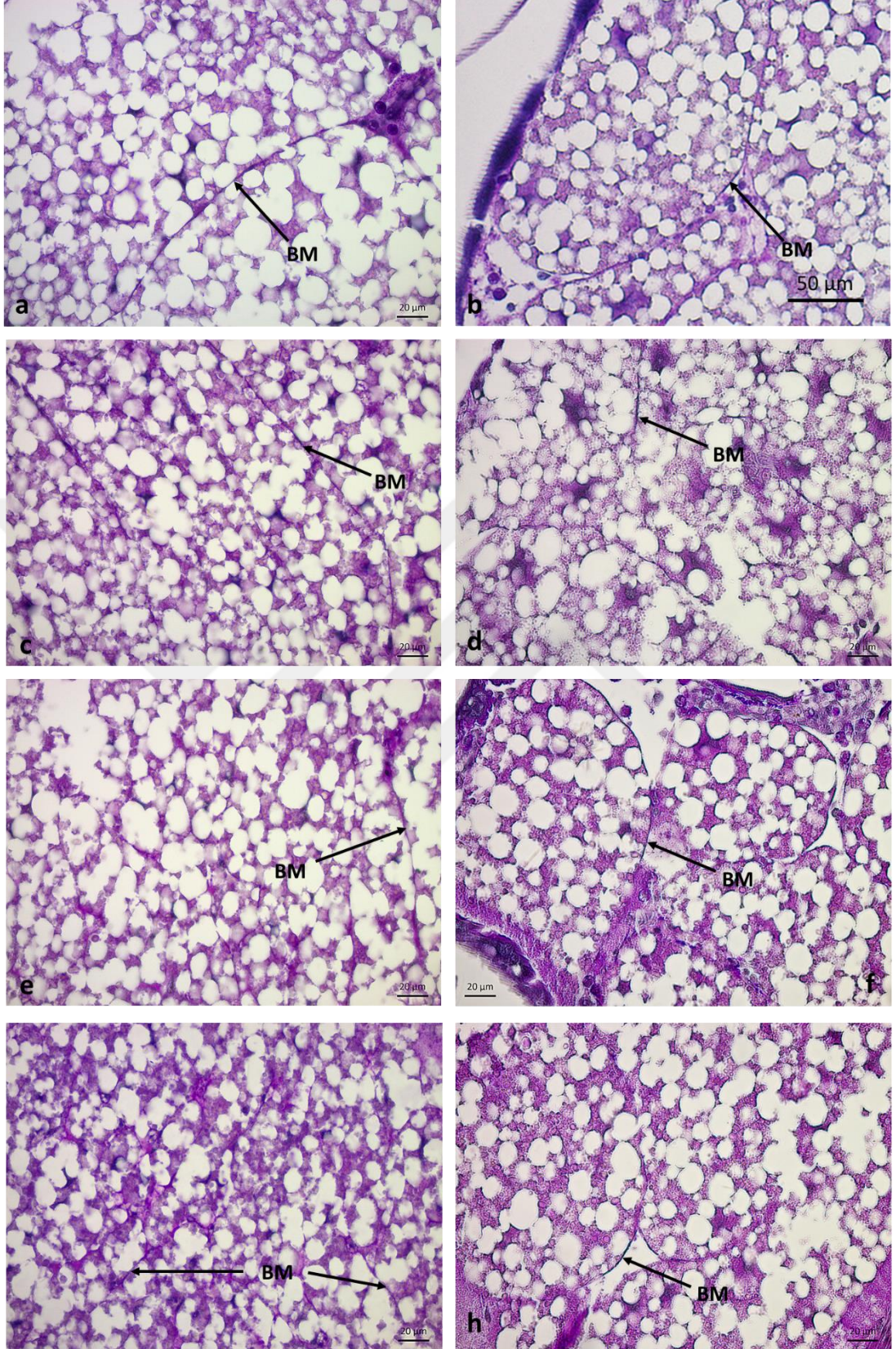




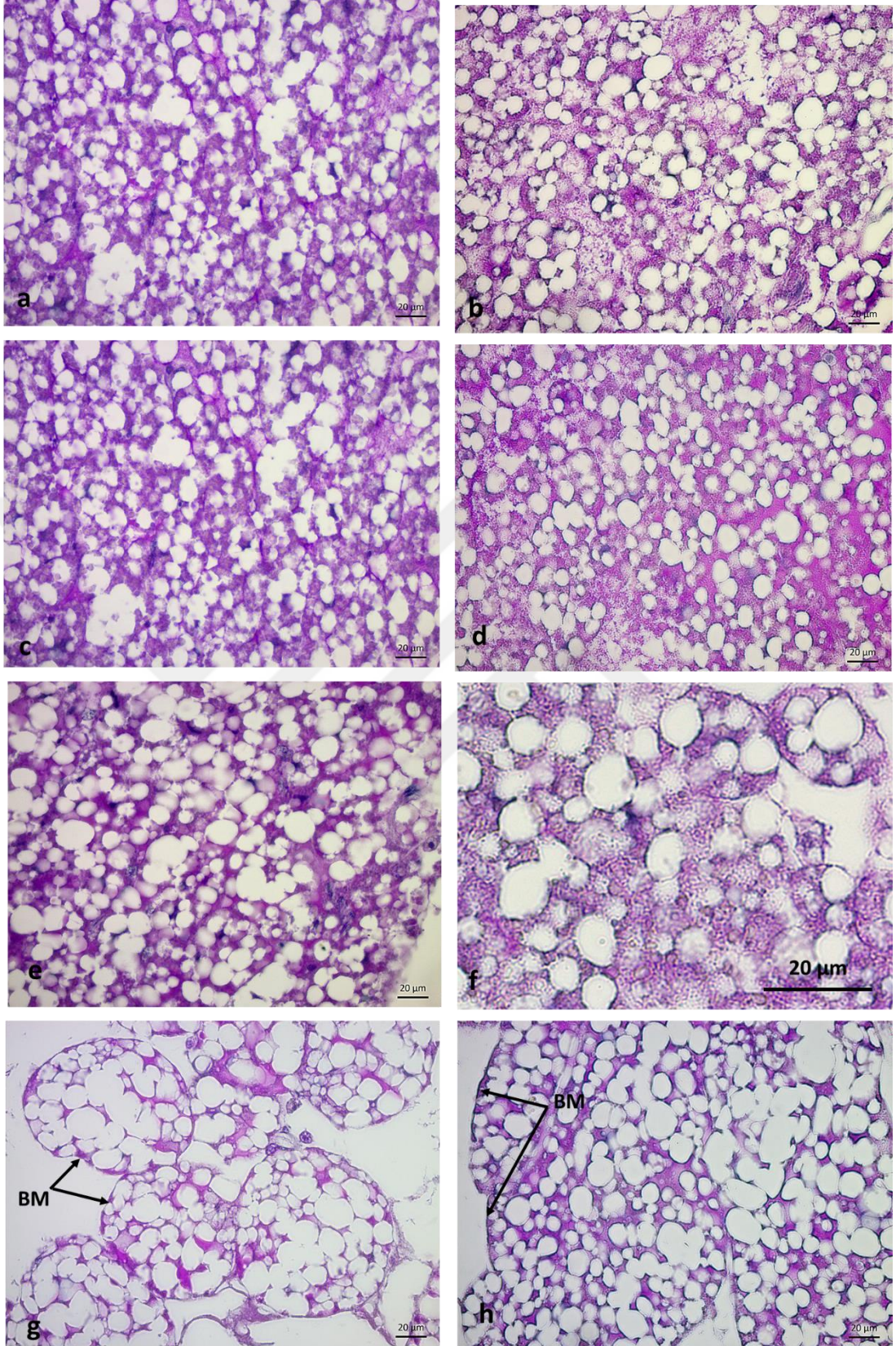
Şekil 4-22. Larval evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri; a) K0, b) Pozitif kontrol, c) K1, d) D1, e) K2, f) D2, g) K3, h) D3.



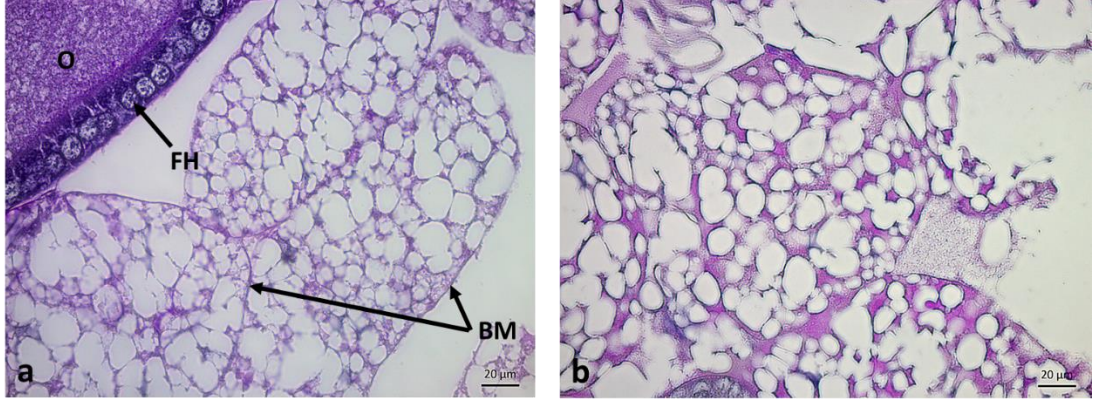
Şekil 4-23. Larval evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri; a) S1, b) D4, c) S2, d) G, e) S3, f) 8-S3, g) S4, h) 8-S4.



Şekil 4-24. Larval ve pupal evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri; a) s5, b) 8-S5, c) P0, d) 8-P0, e) P1, f) 8-P1, g) P2, h) 8-P2.

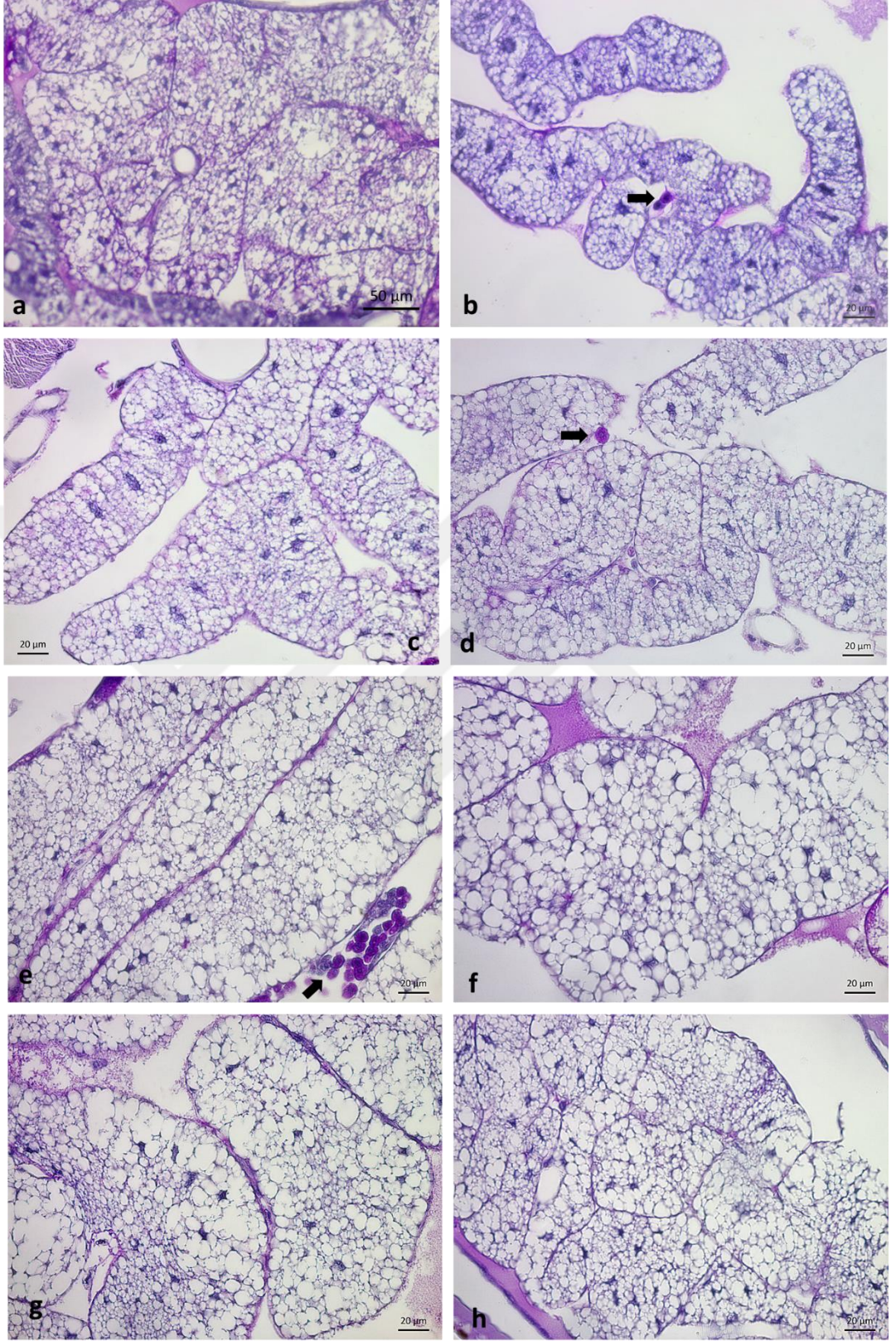


Şekil 4-25. Pupal evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri; a) P3, b) 8-P3, c) P4, d) 8-P4, e) P5, f) 8-P5, g) P6, h) 8-P6.

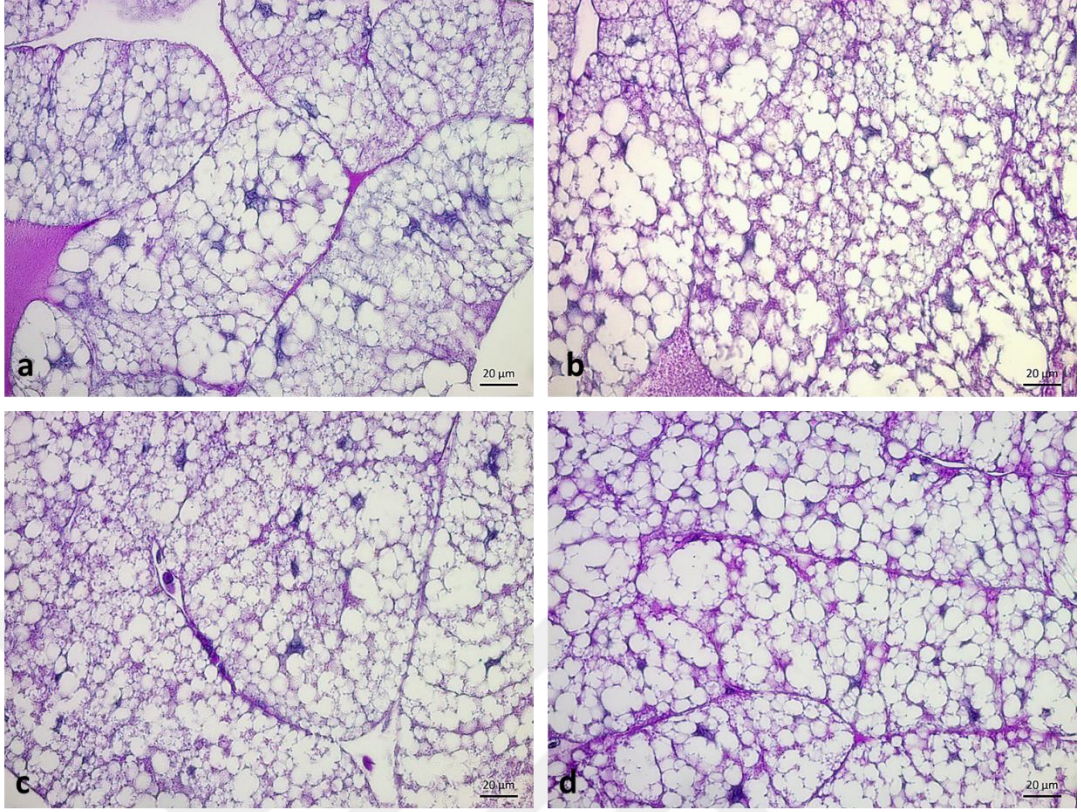


Şekil 4-26. Pupal evredeki trofositlerin histolojik (PAS) görüntüleri; a) P7, b) 8-P7.

5 µg fenoksikarb uygulama grubunda 8. instarda 8. günde (8-8) PAS pozitif reaksiyon veren glikojen granüllerine sitoplazmada belirgin olarak rastlanmıştır (Şekil 4-28a). Özellikle nükleus çevresindeki sitoplazmik bölgede birikim gösteren granüller örme davranışının başlamasıyla belirgin bir şekilde artış göstermiştir (Şekil 4-23 f). Glikojen granülleri pupalaşmaya kadar her gün artmıştır (Şekil 4-23g; 4-27a-h; 4-28 a-d).



Şekil 4-27. Ekstra larval evre (8. instar) trofositlerinin histolojik (PAS) görüntüleri; a) 8-0, b) 8-1, c) 823, d) 8-3, e)8-4, f) 8-5, g) 8-6, h) 8-7.



Şekil 4-28. Ekstra larval evre (8. instar) trofositlerinin histolojik (PAS) görüntüleri; a) 8-8, b) 8-9, c) 8-10, d) 8-11.

4.1.4. Hücre Boyutlarına İlişkin Bulgular ve İstatistiksel Değerlendirme

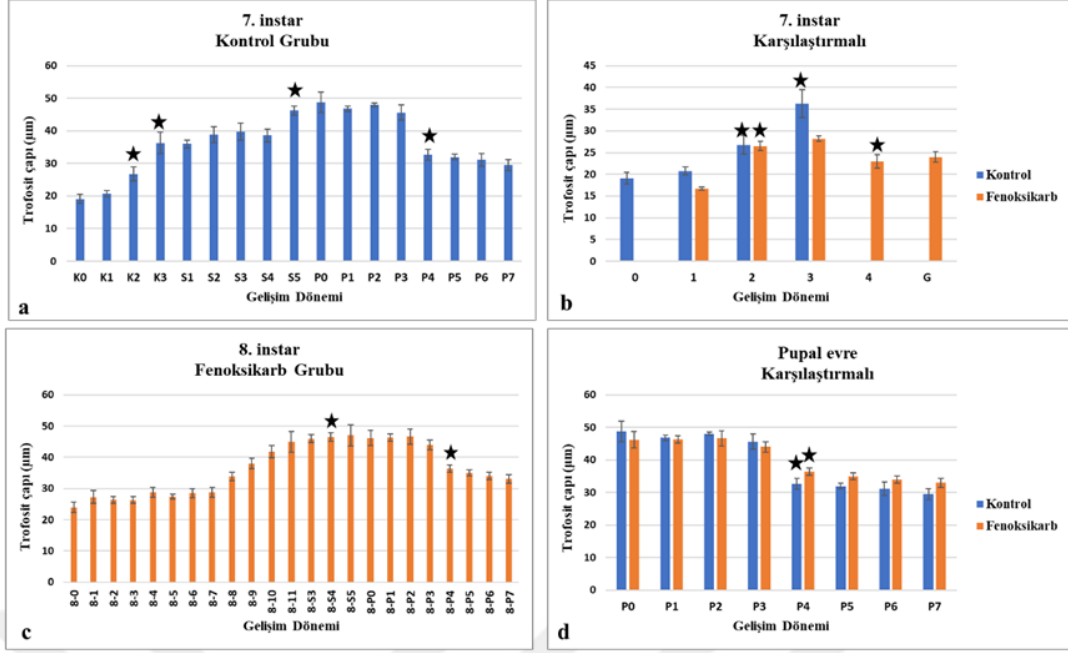
Kontrol grubunda trofosit boyutları larval safhanın başlangıcında ortalama 19 µm olup safhanın ilerlemesiyle artış göstermiştir. Larvanın beslenmeden kesildiği ve kritik ağırlığa ulaştığı S1'de hücre boyutları 36 µm'ye ulaşmıştır. Larvanın beslenmeden kesildiği gezinme ve örme davranışının görüldüğü dönemde (S1-S5) sürekli artış gösteren hücre boyutları, pupal safhanın ilk günü ortalama 49 µm'ye ulaşarak ölçülen en yüksek değerlere ulaşmıştır (Şekil 4-29a). Pupal safhanın 3. günü (P3) özellikle hücreler arası sınırlar belirgin değildir. Sitoplazmada eozinofilik vakuollerin ve yağ damlacıklarının arttığı, sitoplazma hacminin genişlediği gözlenmiştir. Hücre sınırları seçilebilen hücrelerin ölçümü sonucunda hücre boyutları ortalama 45 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 4-29a, d). Pupal evrenin 3. gününden itibaren hücre boyutlarında aşamalı olarak küçülme meydana gelmiştir.

Fenoksikarb uygulama grubunun 1. gününde kontrolden farklı olarak ilk göze çarpan hücre boyutlarının 0. günden daha küçük olmasıdır. 0. gün ortalaması 19 µm

iken, 1. gün ortalamaları (D1) 16 μm olarak ölçülmüştür. En küçük hücre boyutu 15 μm , en büyük hücrenin boyutu ise 17 μm olarak tespit edilmiştir. Uygulamanın yapılmasının ardından küçülen hücreler, istatistiksel olarak da anlamlı bulunan hızlı bir büyüme ile 2. gün kontrol grubuyla aynı boyutlara (~26 μm) ulaşmıştır. Deri değişimine yaklaştıkça hücre boyutları tekrar düşerek ortalama 24 μm olarak ölçülmüştür. Uygulama grubunun 7. instarında hücre büyüklükleri en fazla ortalama 23 μm 'ye ulaşırken, kontrol grubunda örme davranışından hemen önce 36 μm 'ye ulaşmıştır. Hücre ölçümlerine ilişkin grafik Şekil 4-29'da verilmiştir. Kontrol grubu ile fenoksikarb uygulama grubu 7. instar hücre boyutlarının karşılaştırmalı grafiği ise Şekil 4-29b'de verilmiştir.

8. instarda hücre boyutlarının, kontrol grubu 7. instar hücre boyutlarından büyük olduğu ölçülmüştür. 7. instarın 0. günü ortalama 19 μm olarak ölçülen hücre büyüklüğü 8. instarın 0. günü 25 μm olarak ölçülmüştür. En küçük hücre 20 μm iken en büyük hücre 37 μm olarak tespit edilmiştir. Larval safhanın sonuna kadar dereceli olarak artış gösteren hücre boyutları pupal deri değişiminden önce 47 μm 'ye ulaşmıştır. Kontrol grubundaki farat pupada ise bu değer ortalama 46,3 μm olarak ölçülmüştür (Şekil 4-29c).

Pupal safha hücre boyutlarına ait değerler incelendiğinde ilk 3 gün süresince kontrol grubuyla aralarında önemli bir fark gözlenmemiştir. Yaklaşık olarak hücre boyutları 47 μm civarındadır. Pupal safhanın sonuna doğru uygulama grubu yağ doku hücreleri kontrol grubuna benzer şekilde küçülme eğilimindedir (Şekil 4-29 d).



Şekil 4-29. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarında trofosit hücre boyutlarının ortalamaları grafikleri.

Trofosit hücre çaplarının analizi için veri seti Kruskal-Wallis sıralamalı tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Trofosit boyutlarında meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı değişimler Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir. Elde edilen p değeri Tablo 4-4'te verilmiştir.

Tablo 4-4. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu trofosit boyutlarına ilişkin Mann-Whitney U testi değeri değerleri *: İstatistiksel olarak anlamlı değişimler

GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri
0-1	0,393	S5-P0	0,481	D1-D2	0,000*	8-4/8-5	0,529	8S4/8S5	0,796
1-2	0,009*	P0-P1	0,280	D2-D3	0,280	8-5/8-6	0,579	8S5/8P0	0,912
2-3	0,043*	P1-P2	0,280	D3-D4	0,015*	8-6/8-7	0,853	8P0/8P1	0,739
3-S1	0,739	P2-P3	0,280	D4-G	0,684	8-7/8-8	0,063	8P1/8P2	0,853
S1-S2	0,353	P3-P4	0,000*	G-8-0	0,631	8-8/8-9	0,075	8P2/8P3	0,436
S2-S3	0,739	P4-P5	0,739	8-0/8-1	0,190	8-9/8-10	0,190	8P3/8P4	0,002*
S3-S4	0,684	P5-P6	0,796	8-1/8-2	0,912	8-10/8-11	0,247	8P4/8P5	0,315
S4-S5	0,002*	P6-P7	0,739	8-2/8-3	0,971	8-11/8S3	0,089	8P5/8P6	0,481
				8-3/8-4	0,218	8S3/8S4	0,004*	8P6/8P7	0,684

4.1.5. TUNEL Bulguları

Galleria mellonella'da kontrol ve uygulama grubundan alınan yağ doku örneklerinde DNA fragmentasyonunu belirlemek için TUNEL yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla, kontrol grubundan 7. instarın 1. günü (K1), örme davranışının

gözlemlendiği ve büyük ekdizon piki ardından bağırsak boşalmasının gerçekleştiği S3, pupal deri değişiminin hemen ardından pupanın 0. günü (P0), pupal safhanın 3. günü (P3) ve sonunda 6. günü (P6)'ne ait kesitler, TUNEL analizi gerçekleştirmek için seçilmiştir. Analizi gerçekleştirilen günler 20HE salınımına göre seçilmiştir.

Kontrol grubunda 7. instarın tüm günlerinde kesitler TUNEL negatiftir. DAPI kullanılarak yapılan nükleer boyamalarda herhangi bir nükleer yoğunlaşmaya rastlanmamaktadır. Pupal safhanın 3. günü elde edilen kesitlerde taranan tüm alanda yalnızca bir adet trofositte TUNEL pozitif reaksiyonu tespit edilmiştir. Diğer hücrelerde yine nükleer yoğunlaşmaya ait bir işarete rastlanmamıştır (Şekil 4-30).

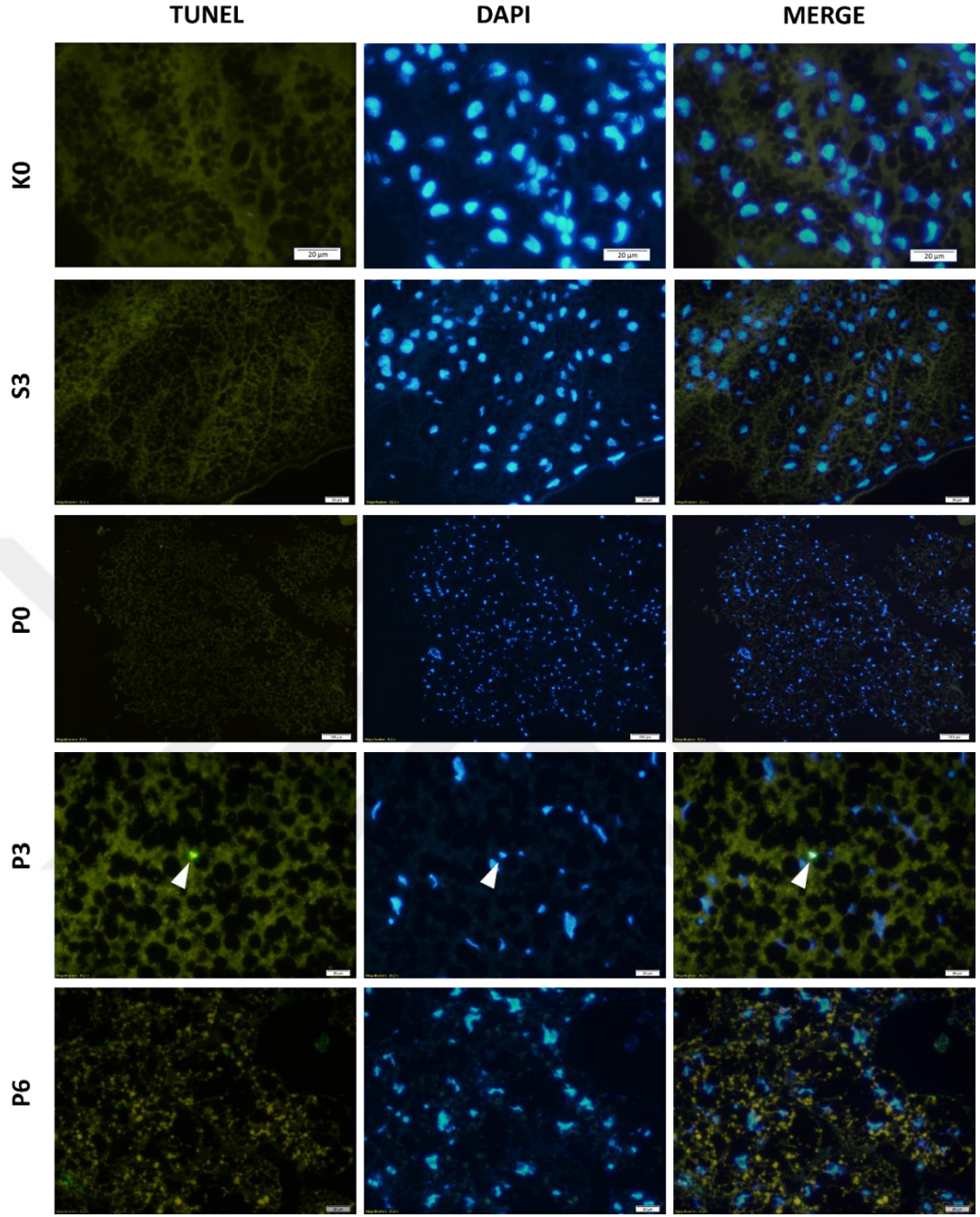
7. instarın 0. gününü 5 µg fenoksikarb uygulaması yapılan grupta 1. gün (D1), ekstra larval deri değişiminin gerçekleştiği gün (G), ekstra larval safhada ekdizon salınımının pik yapmasıyla bağırsak boşalmasının gerçekleştiği 8-S3, pupal deri değişiminin hemen ardından 0. gün (8-P0), pupal safhanın ortası 3. günü (8-P3) ve sonuna ait 6. günü (8-P6)'ya ait kesitlerde TUNEL yöntemi uygulanmıştır. 20HE değişimlerinin olduğu günler, analiz günleri olarak seçilmiştir (Şekil 4-31; 4-32).

Uygulama grubunda TUNEL pozitif reaksiyona ve nükleer yoğunlaşmaya rastlanmamıştır. Pozitif kontrol olarak Merck 90422 kodlu preparat kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise kontrol gurubu pupal safhanın 3. gününe ait kesitler kullanılmıştır. Sadece işaretleme solüsyonu ile muamele edilen kesitlerde nükleusta TUNEL pozitif reaksiyon belirlenmemiştir (Şekil 4-32).

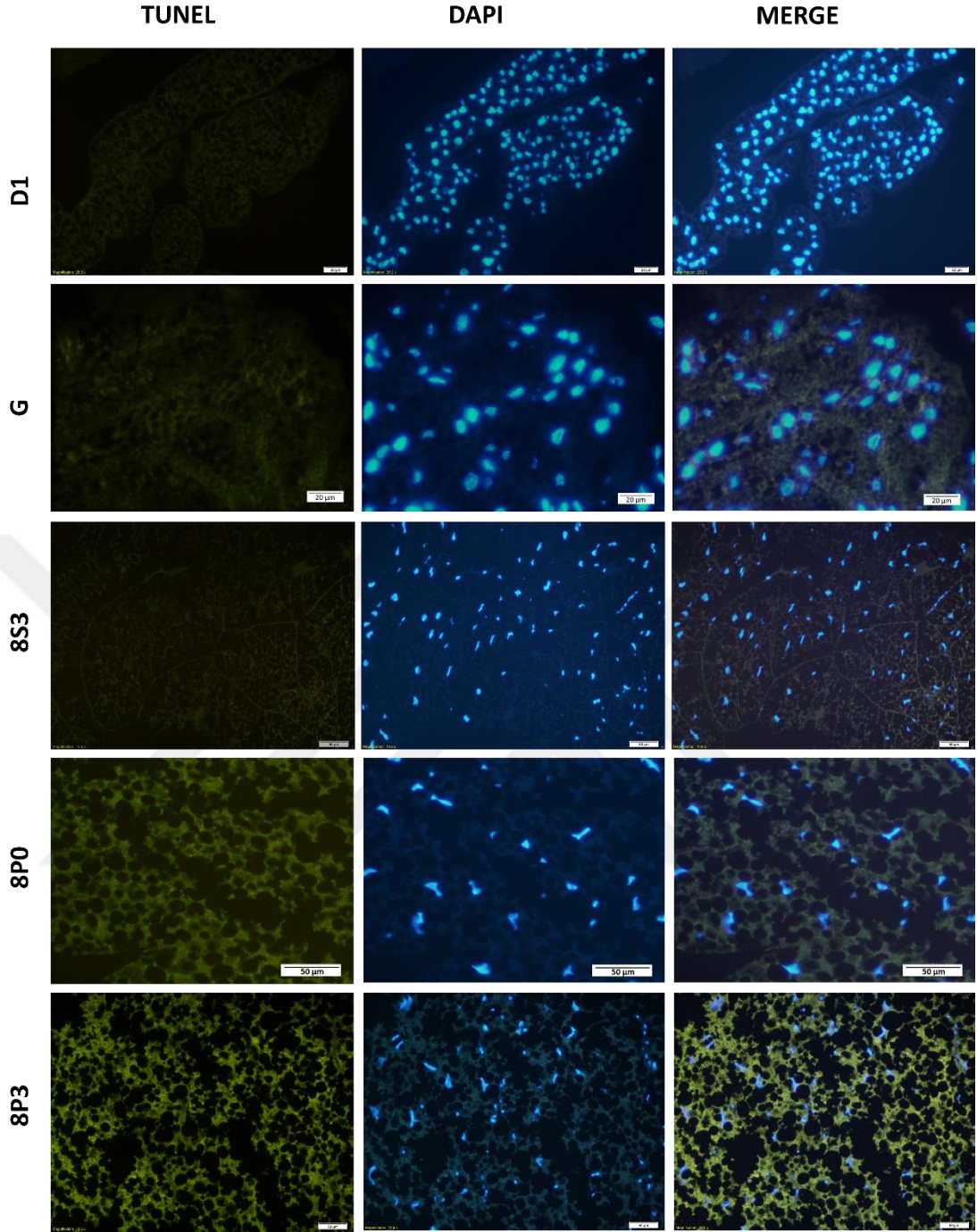
TUNEL yönteminde karşılaşılan en büyük problem larval safha ile aynı uygulamaya tabi tutulmasına karşın, pupal safhada trofositlerin sitoplazmik alanlarında meydana gelen ışımalarıdır. TUNEL kitinde yeşil ışımaya neden olan "Floresan isot inosinat" (FITC) molekülü gibi ışıma yaptığı görülen sitoplazmik bölgelerin yoğun arka plan ışıması oluşturduğu görülmektedir. Bu ışıma nükleer ışımaya oranla zayıf kalsa da beklenen veya olması istenilen bir durum değildir. Özellikle pupanın 3. ve 6. günleri sitoplazmik alanlarda, vakuollerde olduğu düşünülen ışımalar artış göstermiştir (Şekil 4-30; 4-31; 4-32). Histolojik preparasyon işlemlerinin tümünde pupal safhada hücrede değişen ve artış gösteren materyal birikiminin neden olduğu vakuoller nedeniyle elde edilen görüntülerde rezolüsyon azalmaktadır.

Yaşanılan bu problemin kaynağının gelişim dönemiyle farklılık gösteren sitoplazmik kompozisyonlar olduğu düşünülmektedir.

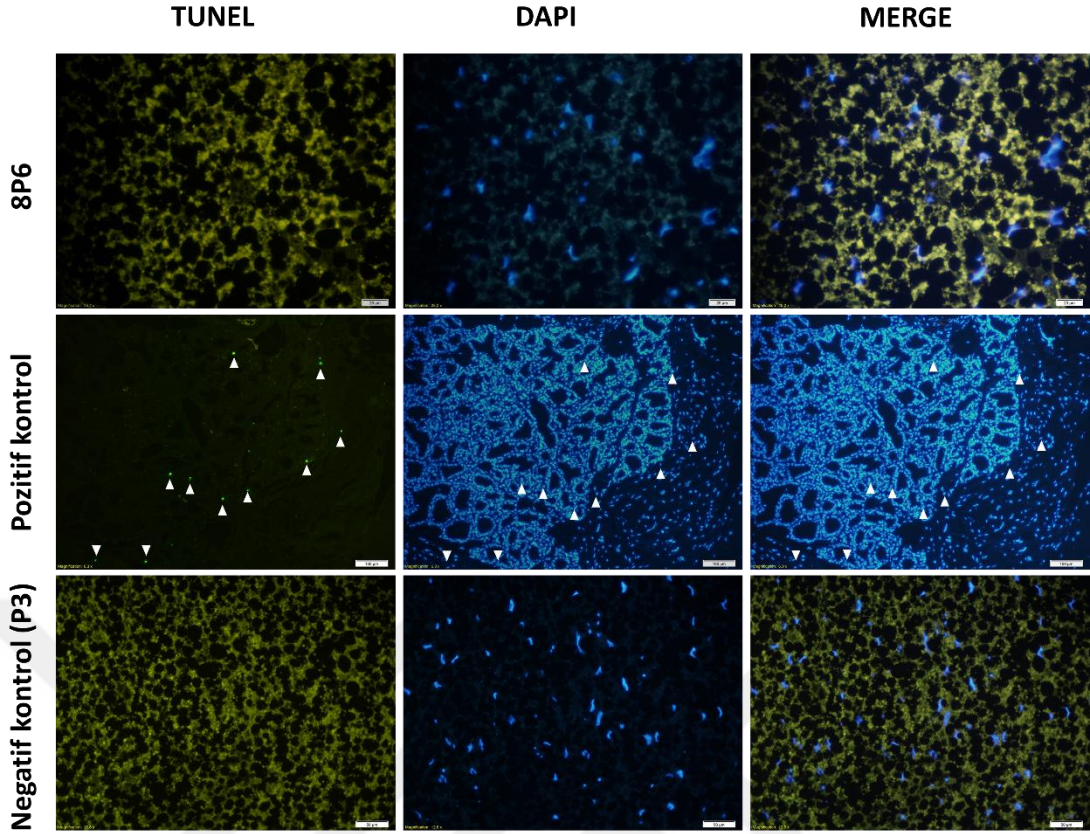
Bu durumun üstesinden gelmek amacıyla çalışmanın başlangıcında uygulanan proteinaz K ile muamele süresi 20 dakikadan 45 dakikaya çıkarılmıştır. Bunun yanı sıra nükleer bir boya olan DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile karşıt boyama gerçekleştirilmiştir. Bu sayede kesitlerde nükleusların lokalizasyonu belirlenmiştir. DAPI, çift sarmal DNA'nın A-T bakımından yoğun bölgelerine güçlü bağlanma özelliğine sahip floresan bir boya maddesidir [104]. FITC bağlanması ile ya da kendiliğinden pozitif ışımaya görülen tüm alanlar DAPI ile nükleus işaretlemesi gerçekleştirilerek karşılaştırılmış, fotoğraflar mikroskobun yazılım programı vasıtasıyla çakıştırılarak MERGE görüntüleri elde edilmiştir. Hem FITC hem de DAPI ile ışımaya yapan nükleer bölgeler tespit edilmiştir ve TUNEL pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif hücreler fotoğraflarda ok ucu işareti ile gösterilmiştir (Şekil 4-30). Sitoplazmik alanlarda yoğun arka plan ışımaya nedeniyle pozitif reaksiyon gibi görünmüş olsa da DAPI ile yapılan nükleer karşıt boyama pozitif reaksiyonun sitoplazma da gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 4-30. Kontrol grubuna ait larval ve pupal evre trofositlerinde apoptotik hücreler (TUNEL). \blacktriangleright : TUNEL pozitif hücre, Barlar K0, P3, P6 (20 μ m), P0 (100 μ m).



Şekil 4-31. 5µg fenoksikarb uygulama grubuna ait larval ve pupal evre trofositlerinde apoptotik hücreler (TUNEL). Barlar D1, G (20 µm), 8-S3, 8-P0, 8-P3 (50 µm).



Şekil 4-32. 5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait pupanın 6. günü (8-P6) trofositlerinde apoptotik hücreler. ▷: TUNEL pozitif hücre, Barlar: 8-P6 (20 µm), Pozitif kontrol (100 µm), Negatif kontrol (50 µm).

4.1.6. Spesifik Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Bulguları

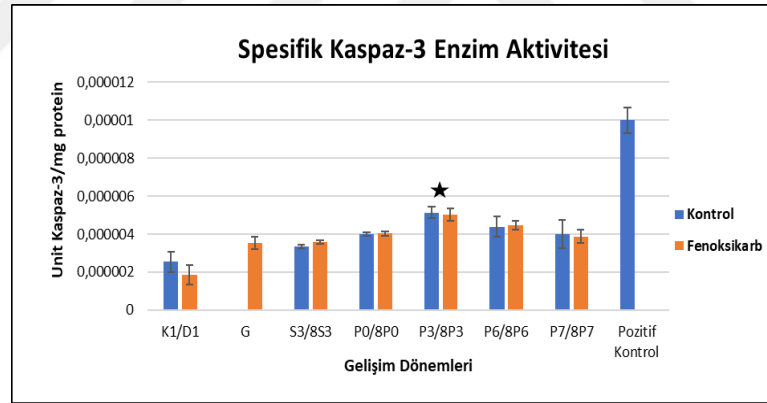
Elektron mikroskobu ve TUNEL yönteminin gerçekleştirildiği hormonal değişimlerin en çarpıcı olduğu gelişim dönemleri seçilerek, bu gelişim dönemlerine ait spesifik kaspaz 3 enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Spesifik kaspaz 3 enzim aktivitesinin pupal safhanın 0. gününe kadar düşük düzeyde olduğu ve bugünden sonra artışa geçerek pupal safhanın 3. gününde pik yaptığı tespit edilmiştir. P3'te gerçekleşen bu yükselişin istatistiksel olarak da anlamlı bir değişim olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-5). P3'ten itibaren pupal safhanın sonuna kadar kademeli olarak azalış meydana gelmiştir (Şekil 4-33).

5 µg fenoksikarb uygulama grubunda gerçekleşen spektrofotometrik analizlerde, 8. instarda spesifik kaspaz 3 enzim aktivitesinin, kontrol grubu 7. instar

seviyesinden ve kontrol grubu pupal kaspaz 3 seviyesi ile yakın değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve fenoksikarb uygulama gruplarına ait enzim aktivitesi değerleri her iki grupta da, pupal safhanın 3. günü gerçekleşen pik değeri ile belirlenen tüm gelişim dönemleri arasında en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4-33). Pupal dönemde gerçekleşen pik değeri istatistiksel olarak da anlamlı bir değişim olarak tespit edilmiştir (Tablo 4-5).

Spesifik kaspaz 3 enzim aktivitesi bulgularında meydana gelen anlamlı değişimlerin istatistiksel analizi, Kruskal-Wallis sıralamalı tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Spesifik kaspaz 3 enzim aktivitesinde günden güne meydana gelen değişimlerin istatistiksel anlamda anlamlı olup olmadığı ise Mann-Whitney-U testi ile belirlenmiştir. Elde edilen p değeri Tablo 4-5’de verilmiştir. Kontrol ve fenoksikarb uygulama grupları kendi içlerinde bir önceki güne göre anlamlı değişimi P3 ve 8-P3’te göstermişlerdir. Eş gelişim dönemleri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde ise anlamlı bir fark tespit edilememiştir.



Şekil 4-33. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grupları spesifik kaspaz 3 enzim aktivitesi analizi sonuçları. Barlar ortalama ± standart hata'yı göstermektedir. ★ : İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin görüldüğü dönemler.

Tablo 4-5. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu spesifik asit fosfataz enzim aktivitesine ilişkin Mann Whitney-U testi p değer tablosu. *: İstatistiksel olarak anlamlı değişimler.

GD	p değeri	GD	p değeri
K1-S3	>0,05	D1-8/S3	>0,05
S3-P0	>0,05	8S3-8P0	>0,05
P0-P3	0,043*	8P0-8P3	0,036*
P3-P6	>0,05	8P3-8P6	>0,05
P6-P7	>0,05	8P6-8P7	>0,05

4.1.7. Total Protein Miktarı Bulguları

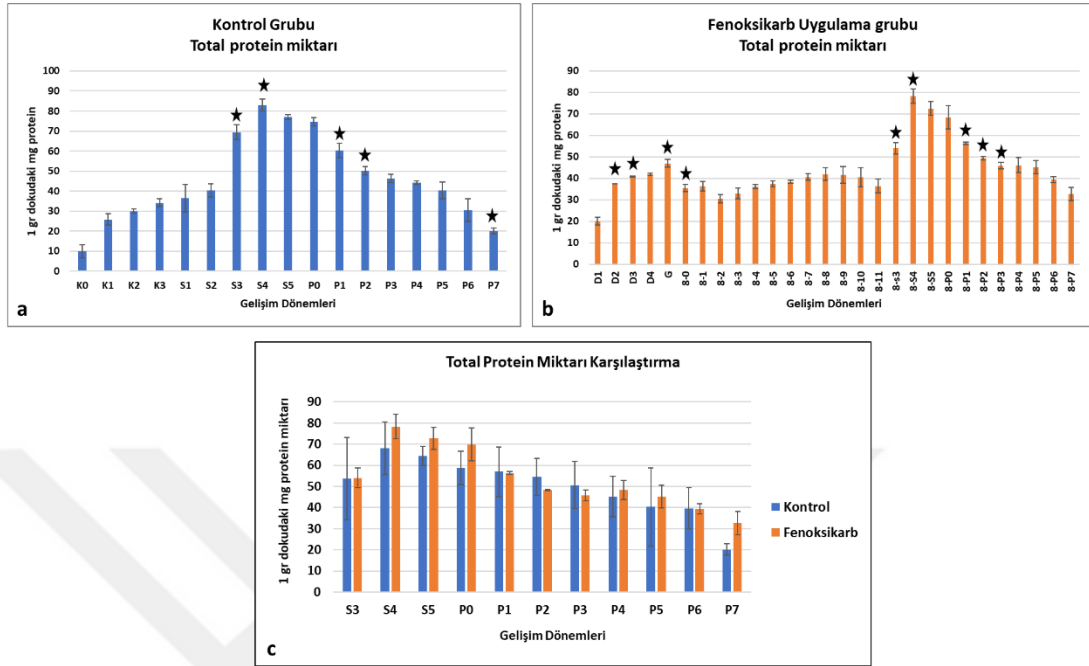
1 g periviseral yağ dokudaki mg cinsinden protein miktarı BCA yöntemiyle hesaplanmıştır. Kontrol ve fenoksikarb uygulama gruplarına ait elde edilen grafikler Şekil 4-35’de verilmiştir.

Kontrol grubunda; örme davranışının gözlenmesine kadar yağ doku total protein miktarı sürekli artış göstermiştir. En yüksek seviye prepupal dönemde (S1-S5) belirlenmiştir. Pupal deri değişiminden hemen önce belirgin bir düşüş tespit edilmiştir. Pupal safhaya geçiş ile protein miktarındaki düşüş, safhanın sonuna kadar devam etmiştir (Şekil 4-34a, c).

5 µg fenoksikarb uygulama grubunda; en belirgin değişim örme davranışıyla yağ dokuda artış gösteren protein miktarının pupal deri değişiminden hemen önce düşüş göstermesidir. Kontrol grubu ile benzerlik gösteren protein miktarı grafiği pupal dönemde de düşme eğilimindedir (Şekil 4-34b, c).

Total protein miktarı analizi için veri setine Kruskal-Wallis sıralamalı tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Total protein miktarında günden güne meydana gelen değişimlerin istatistiksel anlamda anlamlı olup olmadığı Mann Whitney-U testi ile belirlenmiştir. Elde edilen p değeri Tablo 4-6’te verilmiştir. S3 ve 8-S3 dönemlerinde her iki grupta da bir önceki güne göre anlamlı ($p<0,05$) protein miktarı artışı tespit edilmiştir. Artış S4 ve 8-S4’te de yine anlamlı bulunmuştur. Pupal deri değişiminin ardından düşüşe geçen ve safha sonuna kadar kademeli olarak azalan total protein miktarı, kontrol grubunda P1, P2 ve P7’de, fenoksikarb uygulama grubunda 8-P1, 8-P2 ve 8-P3’te istatistiksel olarak bir önceki güne göre anlamlı seviyede azalmıştır. Kontrol grubu ile fenoksikarb uygulama gruplarının eş gelişim dönemleri

karşılaştırmalı olarak incelendiğinde total protein miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4-34. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu total protein miktarı grafikleri. Barlar ortalama ± standart hata'yı göstermektedir. ★: İstatistiksel olarak anlamlı ağırlık değişiminin görüldüğü gelişim dönemleri.

Tablo 4-6. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu total protein miktarına ilişkin Mann Whitney-U testi p değer çizelgesi. *: İstatistiksel olarak anlamlı değişimler.

GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri
0-1	>0,005	S5-P0	>0,005	D1-D2	0,050*	8-4/8-5	>0,005	8S4/8S5	>0,005
1-2	>0,005	P0-P1	0,05*	D2-D3	0,05*	8-5/8-6	>0,005	8S5/8P0	>0,005
2-3	>0,005	P1-P2	0,05*	D3-D4	>0,005	8-6/8-7	>0,005	8P0/8P1	0,05*
3-S1	>0,005	P2-P3	>0,005	D4-G	0,05*	8-7/8-8	>0,005	8P1/8P2	0,05*
S1-S2	>0,005	P3-P4	>0,005	G-8-0	0,05*	8-8/8-9	>0,005	8P2/8P3	0,046
S2-S3	0,05*	P4-P5	>0,005	8-0/8-1	>0,005	8-9/8-10	>0,005	8P3/8P4	>0,005
S3-S4	0,05*	P5-P6	>0,005	8-1/8-2	>0,005	8-10/8-11	>0,005	8P4/8P5	>0,005
S4-S5	>0,005	P6-P7	0,05*	8-2/8-3	>0,005	8-11/8S3	0,05*	8P5/8P6	>0,005
				8-3/8-4	>0,005	8S3/8S4	0,05*	8P6/8P7	>0,005

4.1.8. Spesifik Asit Fosfataz Enzim Aktivitesi Bulguları

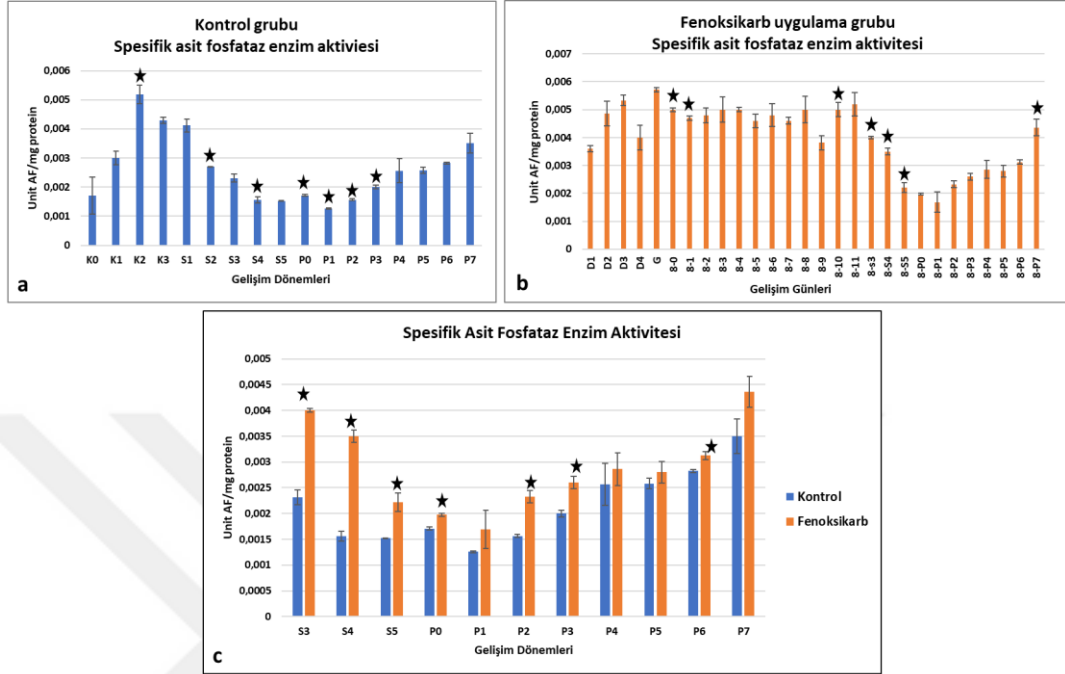
Kontrol grubunda; spesifik asit fosfataz enzim aktivitesindeki artış beslenmenin gerçekleşmediği pupal safha süresince artış göstermiştir. Pupal safhanın son günlerinde total protein miktarı en düşük seviyelerine ulaştığı halde, spesifik asit

fosfataz enzim aktivitesinin en yüksek seviyelerine ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4-35a, c).

5 µg fenoksikarb uygulama grubunda; uygulamanın yapıldığı ilk günlerden ekstra larval deri değişimine kadar enzim aktivitesi artış göstermiş olup, beslenmeden kesildiği ve deri değiştirdiği gün (G) en yüksek seviyelere ulaşmıştır. Larval deri değişimiyle birlikte yeniden düşüşe geçmiştir. Beslenmenin azaldığı günlerde (8-8/8-S3 arasında) yüksek seviyelerde seyreden asit fosfataz enzim aktivitesi, koza içerisindeki prepupal dönemde (8-S3/8-S5) düşük seviyelerde seyretmiştir. İstatistiksel olarak da anlamlı seviyedeki düşüş pupal deri değişimine kadar devam etmektedir. Pupal deri değişiminin ardından, pupanın son günlerine doğru, kontrol grubu ile benzer olarak enzim aktivitesi artış göstermiştir (Şekil 4-35b, c).

ANOVA (SPSS 20,0) test istatistiğine göre $p > 0,05$ olduğu için varyansların homojen olduğu %95 güvenle tespit edilmiştir. Bu durumda veri setinin günden güne değişip değişmediğini görmek için bağımsız örneklem T-testi uygulaması yapılmıştır. Bu test sonucunda $p < 0,05$ 'ten küçük olduğu parametrelerin iki veri seti arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir. Test sonucu elde edilen p değerleri Tablo 4-7 ve 4-8'de gösterilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda kontrol grubunun ikinci günü (K2) enzim aktivitesinde anlamlı bir artış tespit edildikten sonra beslenmenin kesilmesiyle, özellikle S2'de anlamlı seviyede düşüş kaydedilmiştir. Pupal deri değişiminin ardından yine istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen artışı seyreden düşüş son bulmuş, pupal safhanın sonuna kadar enzim aktivitesi kademeli olarak artmıştır. P1, P2 ve P3 gelişim günlerinde tespit edilen enzim aktivitesi artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Fenoksikarb uygulama grubunda; ekstra larval safhanın ilk günlerinde (8-0/8-1) anlamlı kabul edilen aktivite düşüşünü artış takip etmiş ve safha inişli çıkışlı bir profil sergilemiştir. Beslenmenin kesilmesinin ardından genel hatlarıyla kontrol grubu ile benzer bir profil karşımıza çıkmıştır. Özellikle 8-S3, 8-S4 ve 8-S5'te anlamlı aktivite düşüşü tespit edilmiştir. Pupal deri değişiminin ardından safha sonuna kadar kademeli olarak artış tespit edilmiştir. 8-P7'de gerçekleşen artış bir önceki güne göre anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubu ile fenoksikarb uygulama gruplarının eş gelişim dönemleri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, S3 ile 8-S3, S4 ile 8-S4, S5 ile 8-S5, P0 ile 8-P0, P2 ile 8-P2, P3 ile 8-P3 ve P6 ile 8-P6 enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu

tespit edilmiştir. Fenoksikarb uygulama grubunda enzim aktivitesi genel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4-35).



Şekil 4-35. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait spesifik asit fosfataz enzim aktivitesi grafikleri. Barlar ortalama ± standart hata'yı göstermektedir. ★ : İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin görüldüğü dönemler.

Tablo 4-7. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu spesifik asit fosfataz enzim aktivitesine ilişkin T Testi p değeri tablosu. *: İstatistiksel olarak anlamlı değişimler.

GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri
0-1	>0,005	S5-P0	0,005*	D1-D2	>0,005	8-4/8-5	>0,005	8S4/8S5	0,004*
1-2	0,005*	P0-P1	0,000*	D2-D3	>0,005	8-5/8-6	>0,005	8S5/8P0	>0,005
2-3	>0,005	P1-P2	0,001*	D3-D4	>0,005	8-6/8-7	>0,005	8P0/8P1	>0,005
3-S1	>0,005	P2-P3	0,004*	D4-G	>0,005	8-7/8-8	>0,005	8P1/8P2	>0,005
S1-S2	0,024*	P3-P4	>0,005	G-8-0	0,002*	8-8/8-9	>0,005	8P2/8P3	>0,005
S2-S3	>0,005	P4-P5	>0,005	8-0/8-1	0,044*	8-9/8-10	0,029*	8P3/8P4	>0,005
S3-S4	0,012*	P5-P6	>0,005	8-1/8-2	>0,005	8-10/8-11	>0,005	8P4/8P5	>0,005
S4-S5	>0,005	P6-P7	>0,005	8-2/8-3	>0,005	8-11/8S3	0,047*	8P5/8P6	>0,005
				8-3/8-4	>0,005	8S3/8S4	0,018*	8P6/8P7	0,017*

Tablo 4-8. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarında gelişim dönemlerinin karşılaştırmalı spesifik asit fosfataz enzim aktivitesine ilişkin T Testi p değer tablosu.
*: İstatistiksel olarak anlamlı değişimler.

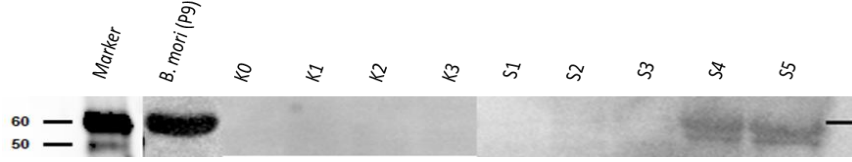
GD	p değeri	GD	p değeri
S3-8S3	0,00*	P2-8P2	0,03*
S4-8S4	0,00*	P3-8P3	0,011*
S5-8S5	0,059	P4-8P4	0,596
P0-8P0	0,04*	P5-8P5	0,4
P1-8P1	0,312	P6-8P6	0,24
		P7-8P7	0,13

4.1.9. Western Blotting ile EcR-B1'in Belirlenmesine İlişkin Bulgular

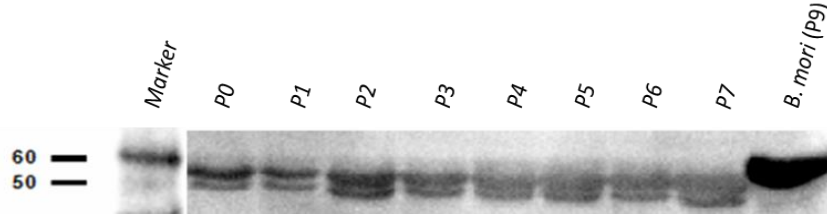
Galleria mellonella periviseral yağ dokusunda meydana gelen programlanmış hücre ölümünde ekdizon reseptör B1 ekspresyonunu araştırmak için western blotting analizi uygulanmıştır. Homojenizasyon ve SDS-PAGE uygulamasının ardından blotting işlemi gerçekleştirilen örnekler primer antibadi olarak ekdizon reseptör B1 proteini (6B7, Developmental studies of Hybridoma Bank) ile inkübe edilmiştir. Söz konusu antibadi EcR-B1'in 33-110 arasındaki aminosit bölgesine (B1-spesifik bölge) spesifiktir.

4.1.9.1. Kontrol Grubu Bulguları

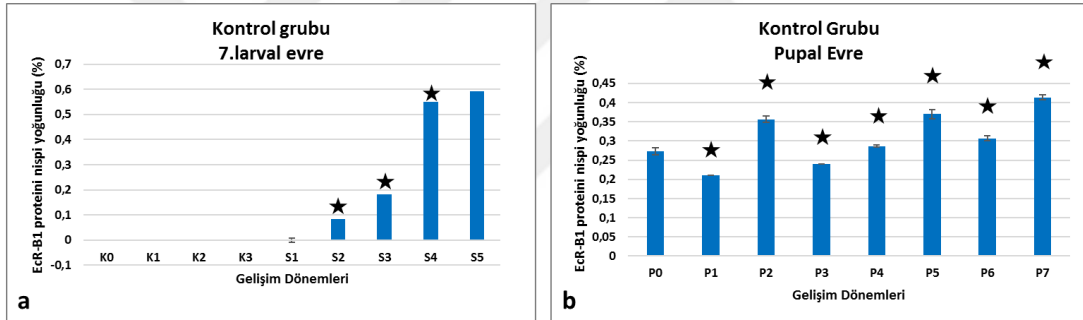
Ekdisteroidler reseptör proteinleri aracılığıyla transkripsiyon faktörü olarak programlanmış hücre ölümünü düzenlerler. *Galleria mellonella*'da son larval instarın başından itibaren aktif beslendiği dönemde EcR-B1 proteini tespit edilmemiştir. Prepupal dönemin başlangıcı olan larvanın beslenmeden kesildiği, gezinme ve örme davranışı gösterdiği dönemde (S1-S5) hemolenfte ekdizon seviyesinin pik yapmasıyla birlikte (S3), EcR-B1 proteini ekspresyonu tespit edilmiş ve giderek artış göstermiştir (Şekil 4-36). Hareketsiz prepupal dönemde (S5) en yüksek düzeyine ulaşmıştır (Şekil 4-38; 4-40). Pupal deri değişiminin gerçekleşmesiyle birlikte EcR-B1 ekspresyon seviyesi bir miktar düşüş gösterse de pupal safhanın sonunda doğru tekrar yükselişe geçmiştir (Şekil 4-40).



Şekil 4-36. Kontrol grubu larval döneme ait EcR-B1 proteini (WB). *B. mori* (P9): pozitif kontrol proteini, *Bombyx mori* periviseral yağ dokusu pupa 9. gün.



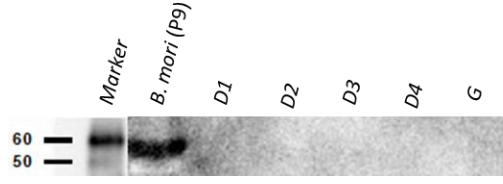
Şekil 4-37. Kontrol grubunda pupal döneme ait EcR-B1 proteini (WB) *B. mori* (P9): pozitif kontrol proteini, *Bombyx mori* periviseral yağ dokusu pupa 9. gün.



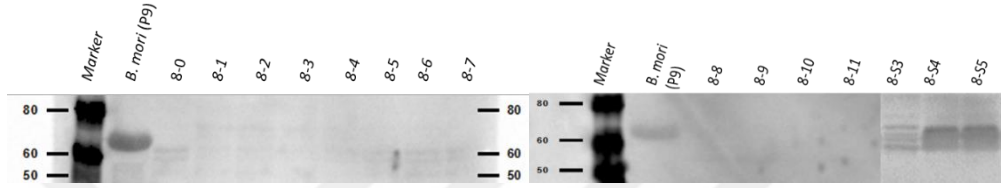
Şekil 4-38. Kontrol grubu larva ve pupalarına ait EcR-B1 western blot analizleri band nispi yoğunlukları. Barlar ortalama \pm standart hata'yı göstermektedir. ★: İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin görüldüğü dönemler.

4.1.9.2. 5 μ g Fenoksikarb Uygulama Grubu Bulguları

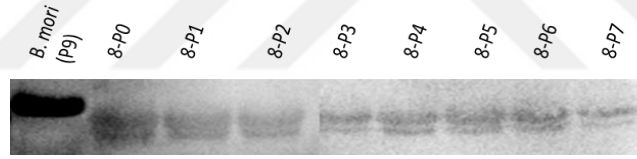
5 μ g fenoksikarb uygulama grubunda ekstra larval deri değişimi gerçekleşene kadar geçen beş gelişim dönemi süresince (D1-G) EcR-B1 proteini belirlenmemiştir (Şekil 4-41). Ekstra larval evre 8. instarın 0. gününden itibaren pupal safhanın ilk gününe kadar olan örneklerde özellikle 8-S3'ten itibaren EcR-B1 proteininin artmaya başladığı ve 8-S5'te bu grup hayvanlarda en yüksek seviyeye ulaştığı western blotting denemelerinde gösterilmiştir (Şekil 4-42). Kontrol grubu pupalarına benzer şekilde uygulama grubu pupalarında, EcR-B1 proteini pupal safhaya ait tüm günlerde tespit edilmiştir (Şekil 4-43).



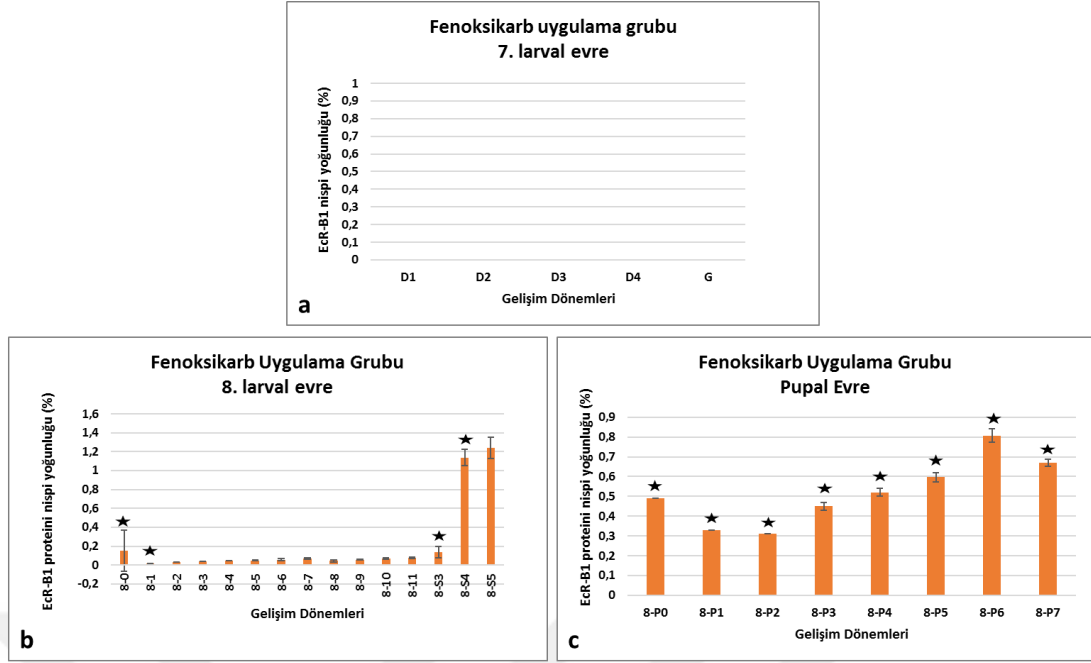
Şekil 4-39. 5 µg fenoksikarb uygulama grubu 7. instar larvalarına ait EcR-B1 proteinin belirlenmesi (WB). *B. mori* (P9): pozitif kontrol proteini, *Bombyx mori* periviseral yağ dokusu pupa 9. gün.



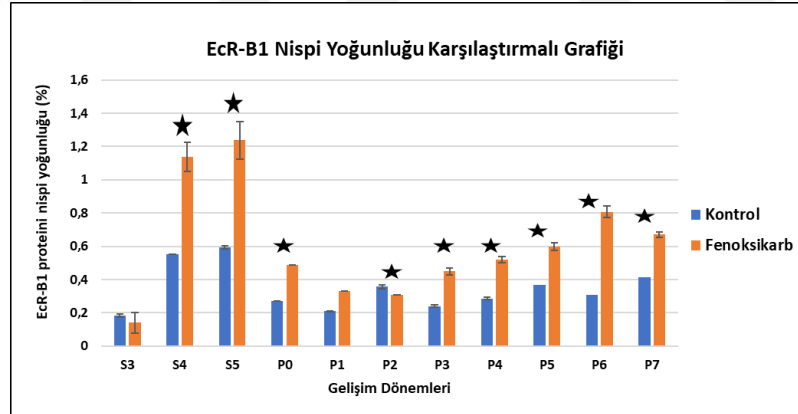
Şekil 4-40. 5 µg fenoksikarb uygulama grubu 8. instara ait EcR-B1 proteinin belirlenmesi (WB). *B. mori* (P9): pozitif kontrol proteini, *Bombyx mori* periviseral yağ dokusu pupa 9. gün.



Şekil 4-41. 5 µg fenoksikarb uygulama grubu pupalarına ait EcR-B1 proteinin belirlenmesi (WB). *B. mori* (P9): pozitif kontrol proteini, *Bombyx mori* periviseral yağ dokusu pupa 9. gün.



Şekil 4-42. 5 µg fenoksikarb uygulama grubu larva ve pupalarına ait EcR-B1 western blot analizleri band nispi yoğunlukları. Barlar ortalama ± standart hata'yı göstermektedir. ★: İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin görüldüğü dönemler.



Şekil 4-43. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda eşdeğer gelişim dönemlerine ait karşılaştırmalı EcR-B1 western band nispi yoğunlukları grafiği. ★: İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin görüldüğü dönemler.

Protein bantları incelendiğinde; kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda, pozitif kontrol olarak kullanılan *Bombyx mori*'de EcR-B1 proteini tek bir bant, *Galleria mellonella* yağ dokusunda ise çift bant olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-38; 4-39; 4-42; 4-43).

EcR-B1 nispi yoğunluğunda meydana gelen anlamlı değişimlerin istatistiksel analizi için Kruskal-Wallis sıralamalı tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır. EcR-B1 nispi yoğunluğunda günden güne meydana gelen değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Mann-Whitney-U testi ile belirlenmiştir. Elde edilen p değeri Tablo 4-9’da verilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda büyük ekdizon pikini takiben bağırsak boşalmasının gerçekleştiği gün (S3/8-S3) her iki grupta da bir önceki güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş gerçekleşmiştir (Şekil 4-40a; 4-44b). Prepupal dönemde yine anlamlı bir yükseliş kaydedilirken (S4/8-S4), pupal deri değişimi ile protein ekspresyon seviyesinde düşüş görülmüştür. Bu değişim uygulama grubunda bir önceki güne göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiş olup pupal safhanın ortasından itibaren yükselişe geçmiştir. Kontrol grubunda ise inişli çıkışlı bir profil sergilemiştir. Safhanın sonuna doğru istatistiksel olarak anlamlı yükseliş tespit edilmiştir. Kontrol ve fenoksikarb uygulama grupları eşdeğer gelişim dönemlerine ait karşılaştırmalı grafik ve istatistik sonuçlarına göre S3 ile 8-S3 ve P0 ile 8-P0 gelişim dönemleri haricinde, tüm gelişim dönemlerinde gruplar arasında anlamlı kabul edilen ($p < 0,05$) fark tespit edilmiştir.

Tablo 4-9. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubuna ait EcR-B1 proteinin nispi yoğunluğunun Mann Whitney testi p değeri çizelgesi. *: İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin görüldüğü dönemler.

GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri	GD	p değeri
0-1		S5-P0	>0,05	D1-D2		8-4/8-5	>0,05	8S4/8S5	>0,05
1-2		P0-P1	0,037*	D2-D3		8-5/8-6	0,05*	8S5/8P0	0,037*
2-3		P1-P2	0,037*	D3-D4		8-6/8-7	>0,05	8P0/8P1	0,025*
3-S1		P2-P3	0,037*	D4-G		8-7/8-8	>0,05	8P1/8P2	0,025*
S1-S2	0,034*	P3-P4	0,034*	G-8-0	0,037*	8-8/8-9	0,05*	8P2/8P3	0,034*
S2-S3	0,043*	P4-P5	0,046*	8-0/8-1	0,037*	8-9/8-10	>0,05	8P3/8P4	0,043*
S3-S4	0,046*	P5-P6	0,046*	8-1/8-2	0,025*	8-10/8-11	>0,05	8P4/8P5	0,043*
S4-S5	>0,05	P6-P7	0,043*	8-2/8-3	0,025*	8-11/8S3	>0,05	8P5/8P6	0,046*
				8-3/8-4	0,025*	8S3/8S4	0,046*	8P6/8P7	0,046*

Tablo 4-10. Kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubunda eşdeğer gelişim dönemlerine ait karşılaştırmalı EcR-B1 proteinin nispi yoğunluğunun Mann Whitney testi p değeri çizelgesi. *: İstatistiksel olarak anlamlı değişimlerin görüldüğü dönemler.

GD	p değeri	GD	p değeri
S3-8S3	0,767	P2-8P2	0,034*
S4-8S4	0,03*	P3-8P3	0,034*
S5-8S5	0,029*	P4-8P4	0,043*
P0-8P0	0,00*	P5-8P5	0,01*
P1-8P1	-	P6-8P6	0,03*
		P7-8P7	0,043*

4.2. Tartışma

Juvenil hormon, holometabol böceklerde larval karakterlerin devamlılığını sağlar. Bu hormonun böcek gelişiminde oynadığı rolün anlaşılmasında, JH aktivitesine sahip olan sentetik böcek büyüme düzenleyicilerinin (JH analogu) keşfedilmesi son derece etkili olmuştur [85, 88]. Birçok böcek türü larval gelişim evresinde, JH analoglarına maruz kalması sonucunda, endokrin dengelerinin bozulduğu ve buna bağlı olarak da anormal gelişimlerin ortaya çıktığı bulunmuştur [85, 88, 105].

Bu çalışmada, *Galleria mellonella* larvalarında JH'un yağ dokunun yeniden şekillenme süreçlerinde üstlendiği rol bir JHA olan fenoksikarb uygulamasıyla belirlenmiş ve tüm bu süreçlerde 20HE'nin yağ dokunun yeniden şekillenme süreçlerindeki etkisi, reseptör proteinin EcR-B1 ile bağlantılı olarak ortaya konmuştur. Daha önce holometabol böceklerde yapılan çalışmalarda, JH seviyesi larval evreler arasında yalnızca son larval evrede oldukça düşük seviyelerde olduğu bulunmuştur ve bu evre JH uygulamalarına son derece hassas olarak kabul edilmektedir [106]. Bu nedenle, çalışmamızda JH uygulamaları son larval evrede yapılmış ve diğer larval evrelerden farklı olarak son larval evrenin başlangıcında hemolenfte yüksekten çok düşük seviyelere inen JH'nun dışarıdan uygulanan JHA fenoksikarb ile artırılarak larvada meydana getirdiği değişimler incelenmiştir. Çalışmamızda, böcek fizyolojisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan *Galleria mellonella* larvalarında fenoksikarbin meydana getirdiği değişimlerin tartışılması aşağıda ayrı ayrı yapılmıştır.

4.2.1. Son Larval Evre Üzerine Fenoksikarbin Etkileri

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular 7. instarın 0. gününün fenoksikarba karşı hassas olduğunu göstermiştir. 750 ng'ın altındaki doz uygulamalarında fenoksikarbin larval gelişim süresi üzerine etkisinin oldukça az olduğu ve larval süreyi ancak %10'luk larva grubunda 1-2 gün uzattığı belirlenmiştir (Tablo 4-1). Oysaki, lepidopterlerle yapılan diğer çalışmalarda, bizim bulgularımızın aksine, son larval safhanın başlangıcında daha düşük doz uygulamalarında bile JHA'ların mevcut larval süreyi uzattığı belirtilmiştir [105, 107].

Son larval evrede uygulanan yüksek doz, JH ve analoglarının larvayı öldürmediği, gezinme ve örme davranışı göstermeden ve pupalaşmadan bir ay kadar canlı kaldığı belirtilmektedir. Bu larvalar için "kalıcı larva" adı verilmektedir [85, 105,

108]. 250, 500 ve 750 ng'lık uygulama gruplarında, son larval safhada kalıcı larva elde edilme oranı (%10) olup bu oran yapılmış olan çalışmalardan daha düşük oranda gerçekleşmiştir. Diğer larvalarda ise karararak ölme, gelişim geriliği, zayıf ve sağlıklı larvalar ve ayrıca ekstra larval deri değişimi gözlenmiştir. Daha yüksek doz uygulamaları ise (1, 2, 5 ve 10 µg) larvalarda ekstra larval deri değişimine neden olmuştur.

Son larval evrede, *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera)'ya farklı dozlarda bir JHA olan ZR-619'ın oral yolla uygulanmasının ardından larvalarda mevcut larval safhanın uzaması, larval-pupal araform oluşumları ve ekstra larval deri değişimi gibi durumların hepsi değişik oranlarda görülmüştür [109]. *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera) türünde son larval instarın 0. günü uygulanan 10 µg fenoksikarb pupalaşmayı engellemiş ve %30 oranında ekstra larval instar ile %30 oranında ara form oluşumuna neden olmuştur [93, 110]. *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera)'nın son larval instar larvalarına 0,1 ile 10 µg arasında yapılan topikal fenoksikarb uygulamalarının ise, kalıcı larva oluşumu, ekstra larval deri değişimi (nadiren) ve larval-pupal araform gibi durumlara neden olduğu ve erginleşmeden ölüm oranının %90-100 olduğu belirtilmiştir [87]. *Bombyx mori* (Lepidoptera)'de 0. gün larvalarına 1 ng fenoksikarb uygulaması, mevcut larval evrede beslenme periyodunu uzatırken, 10 ng fenoksikarb uygulaması pupalaşmayı engelleyerek kalıcı larvaların oluşumunu tetiklemiş ve fenoksikarb uygulamaları larval pupal metamorfozu doza ve uygulama zamanına bağlı olarak geciktirmiş ya da tamamen durdurmuştur [59, 85, 105]. Çalışmamızda ise, yukarıdaki araştırmacıların bulgularından farklı olarak; 0. gün larvalarına yapılan doz uygulamaları Tablo 4-1'de görüldüğü gibi fenoksikarb uygulamalarının larval-pupal metamorfozu engelleyerek ekstra larval evre oluşumuna neden olduğu, yüksek doz uygulamalarının kalıcı larva oluşumunu ise tamamen engellediği tespit edilmiştir. Bu durum, holometabol böceklerdeki genetik farklılıkların fenoksikarbtan etkilenme eşiğini değiştirdiğini ve farklı gelişimsel tepkilere neden olacağını düşündürmektedir.

Galleria mellonella son instar larvalarına yapılan JH ve JHA uygulamalarında Ciemior'e [107] göre mevcut beslenme periyodunda uzamaların görüldüğü, sağlıklı metamorfoz geçirerek pupalaştığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda uygulanan JHA fenoksikarb geniş aralıklı uygulanmasına karşın, son larval evrede belirgin ve

larvaların çoğunluğunda görülen ortak bir yanıt olarak mevcut larval sürede uzama kaydedilmemiştir. JH ve JHA uygulamaları, Sehna and Schneiderman [130]'e göre 132. saatte, Sehna et al., [108]'e göre ise 4 gün içerisinde ekstra larval-larval deri değişimi geçirerek sağlıklı larvalar meydana getirmektedir. Bu durum uygulanan JHA'larının farklı kimyasal özelliklerinin larvalarda farklı tepkilere ve böceklerde farklı gelişim özelliklerine neden olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Sehna et al., [19]'da *Galleria mellonella*'da son larval evrede yeni deri değiştirmiş larvalara korpora allata implantasyonu ve JH uygulaması sonucu, larvalarda ekstra larval deri değişimi görüldüğünü bildirmiştir. JH'ü taklit eden birçok sentetik bileşiğin *Galleria mellonella*'da nispeten etkisiz olduğu daha önce yapılmış çalışmalarda da belirtilmiştir [112]. Bu sonuçlara göre, *Galleria mellonella* larvalarının JH'a hassasiyetinin ve meydana gelen tepkilerin diğer bazı lepidopter böceklerden farklı olduğu anlaşılmaktadır.

Lepidopteri postembriyonik gelişim sürecinde JH ve analogları yardımıyla öldürmek için ya araform üretmek ya da sürekli olarak JH ve analoglarına maruz bırakmak gereklidir [107]. Ekstra larval evreye geçiş veya 7. instarın uzaması letal olmamakla birlikte, JH ve analoglarının protorasik bez fonksiyonlarına yapmış olduğu müdahale, böceklerde letal araform gelişiminden kaçış mekanizması olarak avantaj sağlamaktadır.

Larvaların JH ve analogları uygulamalarına yanıtlarının farklı olmasının altında yatan esas nedenin yaşadıkları habitatla ilgili olduğu düşünülmektedir. Sürekli besinin bulunduğu ve nispeten sınırlı ve sabit bir çevrede yaşayan böceklerde JHA'larına verilen yanıtın tekrarlanabilir larval deri değişimi olabileceği ileri sürülmektedir [113]. Yine de larvaların ekstra deri değişimi geçirmeleri için gerçekleştirilen JH ve analoglarının uygulamaları sonucunda yaşayabilen sağlıklı larvaların elde edilmesi her durumda mümkün olmamaktadır [114].

Ciemior et al., [107]'a göre son larval evrede beslenen *Galleria mellonella* larvalarına yapılan JH ve analogları uygulamaları deri değişiminin başlangıcını hızlandırmıştır. Bu etki hem protorasik bezlerin doğrudan inhibe olması hem de PTTH beyin aktivitesi salınımının modifiye olmasından kaynaklanmaktadır. Protorasik

bezlerin fonksiyonuna bu iki yolla müdahale edilmesi çoğu böceğin JH ve analoglarının ölümcül morfogenetik etkisini ya son larval safhayı uzatarak ya da ekstra larval deri değişimi geçirerek üstesinden gelmesine izin vermektedir.

Sehnal and Granger [115], 7. instar *Galleria mellonella* larvalarının korpora allata'nın allatotropik faktöre duyarlılığının son larval evrenin ilk 48-60 saati boyunca muhafaza edildiğini, daha sonra ise bu hassasiyetin kaybolduğunu tespit etmiştir. Sehnal and Meyer'in [3] *Galleria mellonella*'nın son larval safhasının belirli periyotlar halinde JH'a hassasiyetinin değiştiğini, hassas periyot bitmeden önce hormonun hemolenften kaybolması sonucu normal bir larva-pupa dönüşümüne neden olduğunu ileri sürmüştür. 6 gün süresince beslenen son larval evrenin ikinci yarısında larval-pupal dönüşüm kararının verildiğini ileri sürmüşlerdir. JH'a hassas olunan döneme ulaşmaya kadar ilk 3 günde uygulanan hormonun metabolize edilmesi sonucu herhangi bir değişimin olmadığını tespit etmişlerdir.

Laboratuvar koşullarımızda son larval evrenin beslenme periyodu yaklaşık 3,5 gün sürmüş olup 7. instar toplam 7,5-8 günde sonlanmıştır. Dolayısıyla JH'a hassas periyodun bizim çalışmamızda 3. günden daha erken günlerde gerçekleştiği ön görülmektedir. 0. gün yüksek doz JHA uygulamaları sonucu hemolenfte yüksek JH varlığının sonucu olarak PTTH salınımının baskılandığı ve protorasik bezlerden ekdizon salınımının engellediği düşünülmektedir. Bunun bir sonucu olarak da metamorfik döngünün ihtiyaç duyduğu pupal kabullenmeye neden olan ekdizon sinyalinin yokluğunda safhanın yeni bir larval safhaya geçiş karakteri sergilediği düşünülmektedir.

Bazı böceklerde ekstra deri değişimi sayısının 1'den fazla olmasına neden olabilen mekanizma aksamaları bildirilmiştir. Hatta Lepidopterlerin, uygulanan JH analoglarına 2'den daha fazla larval deri değiştirerek yanıt verebildiğini de bildirilmiştir [114]. Çalışmamızda, nadir de olsa iki ekstra larval deri değişimi geçiren larvalar görülmüştür. Bu larvaların baş kapsülü ölçümleri ile 8. instardan farklı bir gelişim periyodunda oldukları tespit edilmiştir. Beslenmeyen ve ağırlık artışı gözlenmeyen bu larvalar denemelerde kullanılmamıştır.

Brieger [112] ve Plantevin [116] 'de benzer şekilde JH ve JHA uygulaması yapılan son larval evre larvalarının genellikle normal boyutlarının üzerinde gelişim gösterdiğini, larvalar metamorfoza hazırlandıklarında ve ekstra larval evreye geçerken kesildiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda 5 µg fenoksikarb uygulanan larvaların kontrol larvalarına göre daha yüksek ağırlıklara sahip olduğu ve bu ağırlık artışının ekstra deri değişimine girildiğinde düşüşe geçtiği belirlenmiştir (Şekil 4-5, b). Ciemior et al., [107], nadir de olsa beslenme sonrası periyotta juvenil hormon analoglarının larval-pupal dönüşümün uzamasına neden olabileceğini rapor etmiştir. Çalışmamızda larval-pupal dönüşüm sürecine giren, beslenmeden kesilen larvalarda büyük ekdizon piki gerçekleşene kadar geçen sürede (S1-S3) uzama meydana gelmiş, büyük ekdizon pikini ve bağırsak boşalmasını takiben süreç kontrol grubuyla benzer ilerlemiştir.

Galleria mellonella besinine katılan az miktarlardaki kara peteğin larval gelişim oranını artırdığı belirtilmiştir [117-119]. Dadd [119] 'e göre kara petek larvalar için metabolik su kaynağıdır ve larval evreler süresince eğer sentetik besin kullanılacaksa bu karışıma kara petek eklenmesi çok daha yüksek yaşam oranları elde edilmesiyle sonuçlanmaktadır. Bronskil [21] hem maliyeti düşük hem de hazırlaması nispeten daha kolay olan sentetik besin ile kültüründe yüksek yaşam oranına ulaşmıştır. Birçok araştırmacı maliyeti düşük ve hazırlaması pratik olan bu besini kültürlerinde kullanmaktadır [120-122]. Yapılan araştırmalar ışığında Bronskil [21] 'in sentetik besin içeriğinde kara petek miktarı değiştirilmiştir. Denemelerimiz $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ve $\%60 \pm 5$ nispi nem koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Gelişim periyodu süresince larvanın hangi gelişim safhasında olduğu popülasyondan alınan örneklerin baş kapsülü genişliğinin ölçülmesiyle tanımlanmaktadır. Lepidopter böceklerin yaşam döngüsü süresince larval gelişim evrelerinin saptanması amacıyla kullanılan bu teknik Dyar [123] 'ın her larval deri değişiminde bu tür larvaların baş kapsüllerinin sabit bir oranda arttığı bulgusuna dayanır. Bu durum sabit ve optimum düzeyde yetiştirme koşulları altında kabul edilebilir derecede doğru bir tekniktir ve *Galleria mellonella*'da baş kapsülü eni optimal koşullar altında minimum yedi kez değişir [117]. Kalorimetrik ölçümleri temel alan yöntemlerle yapılan metabolizma hızını ölçen çalışmalarda da benzer şekilde *Galleria mellonella*'nın 7 farklı larval evreye sahip olduğu ileri sürülmektedir [117, 124]. 7. larval evrede baş kapsülü genişliğini Beck [117] 2010 µm olarak tespit

etmiştir. Çalışmamızda 7. larval evre baş kapsülü ölçümleri ortalaması Şekil 4-4'te gösterilmektedir. 7. larval evrenin 0. günü 10 ayrı larvanın baş kapsülü ölçümlerinin aritmetik ortalaması 2000 µm (2 mm), boyu 990 µm (0,99 mm) olarak belirlenmiş ve Beck [138] ile aynı değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.2.2. Vücut Ağırlıklarında Görülen Değişimler

Canlı larvaların vücut ağırlıklarının ölçülmesi hayvanların gelişim seviyelerinin belirlenmesinde önemli bir parametredir [117]. Kontrol grubunda bulunan hayvanların vücut ağırlıkları 0. günden itibaren beslenme süresince sürekli artmıştır. 7. instarın başlamasında itibaren 78-84 saat aralığında ise larvaların beslenmeden kesildiği ve ulaşabildikleri en yüksek ağırlık değerlerine ulaşmış oldukları (310 mg) tespit edilmiştir (Şekil 4-5). Elde edilen değer mevcut çalışmalar ile benzerlik göstermektedir [15]. Beslenmenin kesilmesiyle birlikte larval-pupal deri değişimi gerçekleşene kadar ağırlıklarında sürekli olarak bir düşüş kaydedilmiştir. Pupalaşma öncesi larval ağırlık ortalaması 177 mg olarak ölçülmüştür, mevcut çalışmalarda bu değer 200 mg olarak hesaplanmıştır [117]. İpek böceği *Bombyx mori*'de total vücut ağırlığı benzer şekilde larva beslenmeden kesilerek pupal deri değişimi gerçekleştirene kadar sürekli düşüş göstermektedir [85]. Beslenme döneminin sona ermesi, örme aktivitesi ile vücut içerisindeki ipek bezlerinden ipek salgısının artması, ipek bezi, bağırsak gibi canlı vücudunda hacim ve ağırlıkça çok yer kaplayan doku ve organların dejenerasyonu gibi durumların larvalarda meydana gelen vücut ağırlığı azalışının temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Mevcut çalışmalar ile paralel bulgular elde edilmiş olup, literatürde belirtilen *Galleria mellonella*'ların ağırlık ortalamaları arasındaki farkların kültür koşullarından (besin içeriği, nem, sıcaklık, fotoperiyot) kaynaklandığı düşünülmektedir.

0. günde 5 µg fenoksikarb uygulaması yapılan grupta 4 gün süresince aktif beslenme ve bunun sonucunda ağırlık artışı görülmüştür. Larvalar 160-250 mg arasında ortalama 211 mg ağırlığa sahip olup kontrol grubunda S1 safhası ağırlık ortalaması 310 mg olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-5). Deri değiştirme davranışı sergileyen larvaların (G) ağırlıklarında ise düşüş gözlenmiştir. Ağırlık kaybındaki düşüşün kendilerini besin ortamı içerisinde diğer uyarılardan izole etmek amacıyla etraflarına ördükleri koza için ipek bezinden ipek salgısı gerçekleştirmeleri ve beslenmemeleri nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Ekstra larval deri değiştirerek 8. larval evreye geçen larvalarda 8. güne kadar sürekli ve belirgin bir ağırlık artışı gerçekleşmiştir. Bugünden itibaren 11. güne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir ağırlık değişimi kaydedilmemiştir. Ağırlık artışında görülen yavaşlamanın hayvanın boyutlarında meydana gelen aşırı büyüme ile beslenme aktivitesinin baskılanmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. 8. instar larval ağırlık ortalaması en yüksek 596 mg, en düşük 410 mg olarak belirlenmiştir. Böceklerde her larval evre içerisindeki maksimum ağırlık artışı sınırlıdır. Ciemior et al., [107]'a göre *Galleria mellonella*'da larval büyüme kaçıncı larval deri değişimi olduğuna bakılmaksızın 450-530 mg'a ulaştığında geri dnlmeksizin durur. Yapılan araştırmalarda 200-300 mg'a ulaşan larvaların beslenmeden kesildiği [15], ancak bazı kayıtlarda bu ağırlığın 590 mg olabildiği [117] tespit edilmiştir. Sehnal [125] korpora allata implantasyonu ile üretilen süper larvalarda da benzer ağırlık değerlerini tespit etmiştir. Çalışmamızda araştırmacıların tespit etmiş olduğu st sınıra yakın değerlerde pupal gelişime geçiş gerçekleşmiştir.

Yıkım ve yapım süreçlerinin son derece hızlı olduğu pupal dönemde gereken enerjinin tamamı iç kaynaklardan karşılandığı göz önünde bulundurulduğunda kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama gruplarının ağırlıklarında pupal deri değişiminin ardından safha sonuna kadar ağırlıklarında düşüş gözlenmesi beklenen bir durumdur.

Callier and Nijhout [126] çalışmalarında larvaların deri değişiminde vücut hacimlerinin arttığını ancak trake sisteminin herhangi bir büyüme ve gelişme göstermediğini belirtmişlerdir. *Manduca sexta* ile yaptıkları çalışma sonucunda metamorfozu başlatan kritik ağırlık mekanizmasının temelinde büyüyen bireye oksijen sağlayamayan, sabit kalmış trake sistemi olduğunu ileri sürmektedir. Bir larvanın ulaşabileceği azami vücut ağırlığı ve tek bir larval evre içerisinde ulaşılabilen ağırlık artışı tre özgüdür [107, 126]. Araştırmacı Ciemior [107] bu değerin juvenil hormon ve analoglarından etkilenmediğini belirtmektedir. JH ve analogları larval evreyi uzatarak böceğin mümkün olan en büyük boyuta ulaşmasını sağlarlar. Araştırmacı 450 mg üzerindeki larvaların 9. larval evreye geçtiklerini, llebilene en yüksek ağırlığın 526 mg olduğunu tespit etmiştir [107]. Çalışmamızda da 9. larval evreye geçen larvalarda büyüme durmuştur. Bu durumda, çalışmamızda da ekstra 2. deri değişimi geçiren az sayıda larvanın mümkün olan en büyük boyutlara ulaştığı (şekil 4-2; 4-3), artık beslenmeyerek kalıcı larva durumuna geçtiği ve öldüğü söylenebilir.

4.2.3. Yağ dokunun Histolojik ve Sitolojik Yapısı

Galleria mellonella periviseral yağ dokusunda yaygın olarak trofositler ile sayı bakımından daha az ve boyut bakımından daha küçük önositler belirlenmiştir. Trofositler bazal membran tarafından kuşatılmış loplara oluşturmaktadır. Bu loplara arasında ve yaygın olarak kutikular epitel hücrelerinin altında kas doku çevresinde kümelenmeler gerçekleştiren önositlere rastlanmıştır. Bu açıdan *Galleria mellonella* yağ dokusu diğer lepidopterlerde yağ doku morfolojisi ve histolojisi bulguları ile benzer özellikler taşımaktadır [127].

PAS boyama ile yapılan incelemelerde kontrol ve uygulama gruplarında yağ dokuyu çevreleyen bazal membran yapısı pupal safhanın 3. gününden 6. gününe kadar belirlenememiştir. Bu durumda bazal membranın yıkıma uğrayarak ergin yaşamı için yeniden organize olma yoluna gittiği sonucuna ulaşılmıştır. Benzer şekilde, Lepidopterlerde yağ dokunun lobüler yapısının bozulması ve hücrelerin hemosölde süspansiyon haline geçtiği ve etkili faktörlerden birinin hemositler tarafından salgılanan, hücreler arası matriksini yıkıma uğratan katepsin B enzimi olduğu bildirilmiştir [61, 91].

PAS reaksiyonu dokuda karbonhidratların lokalizasyonunu gösteren bir indikatördür [128]. Böceklerde karbonhidratın depo formu glikojen, hemolenfte bulunduğu form trehaloz şekere formudur. Glikojenin birincil depo organı ise yağ dokudur [130]. Histokimyasal açıdan glikojen depolarını içeren granüller PAS pozitif reaksiyon vermektedir. PAS pozitif maddelerin yapılarındaki ve miktarlarındaki değişimler rengin şiddetini değiştirebilir. Vakuollerin artışı ve azalışı PAS ile yoğun veya soluk boyanma ile sonuçlanır. Çalışmamızda kontrol grubunda bağırsak boşalmasının ardından (S3) trofositlerin sitoplazmasında, özellikle nükleus etrafında yoğunlaşan, glikojen granülleri belirlenmiştir (Şekil 4-12). Birikimin pupal safhanın 3. ve 4. en üst seviyeye ulaştığı, 5. gün itibarıyla ise azalmaya başladığı gözlenmiştir (Şekil 4-16). Ergin deri değişimine yaklaşıldığında PAS boyası şiddetinin önemli bir şekilde azaldığı ve soluklaştığı görülmektedir. Bu durum, depo edilen glikojenin çoğunun tükenmiş olduğu şeklinde yorumlanabilir. Trofositlerde katabolizma sonucunda depo rezervlerindeki azalmanın beslenmenin olmadığı pupal dönem süresince enerji kaynağı olarak kullanılmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bunun yanı sıra ecdizon salınımının ardından gerçekleşen bağırsak boşalması ile S3

safhasına geçen larvalarda glikojen rezervlerinin birden artış göstermesi ekdizonun glikojen depolanması üzerindeki etkisini açıkça ortaya koymaktadır.

Uygulama grubunda 7. instardan ekstra larval evreye kadar geçen 4 günlük süreçte glikojen granüllerinde boyanmanın çok belirgin bir artış gerçekleştirmediği gözlemlenmiştir. 8. instarda ise kontrol grubuyla benzer şekilde 8-S3 safhasında PAS pozitif reaksiyonun arttığı pupal safhanın 3. ve 4. günü en yüksek seviyelere ulaştığı, 6. günden itibaren ise belirgin bir düşüş gösterdiği sonucuna varılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırılığında ekdizon salınımı ile gerçekleşen bağırsak boşalması itibarıyla (8-S3) sürecin benzer geliştiği söylenilebilir. Bu durum fenoksikarb uygulama grubu 8-S3 gelişim safhasında, hormonal şartların kontrol grubunda S3 gelişim safhasında ortaya çıkan hormonal şartlarla aynı olduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. PAS pozitif reaksiyonunun kontrol grubuna göre gelişim dönemlerinde daha yoğun boyanması depo rezervlerinin ve total glikojen miktarının daha fazla olabileceğini düşündürmektedir. Bu durumun nedeni olarak 8. instar larvalarının daha uzun süre beslenmesi ve rezervlerin daha fazla oranda biriktirilmesi gösterilebilir.

Önositler PAS pozitif reaksiyon vermiş olup gelişim dönemleri süresince boyanma özelliğinde fark gözlenmemiştir. Zara and Caetano [127], *Pachycondyla villosa* yağ dokusunda yaptıkları çalışmada önositlerin PAS negatif reaksiyon verdiğini belirtmişlerdir. Poyraz vd., [129] ise *Bombyx mori* periviseral yağ dokusunda önositlerin çalışmamızla benzer şekilde PAS pozitif reaksiyon verdiği sonucuna ulaşmışlardır.

Yağ dokunun hücre boyutları beslenmenin gerçekleştiği larval gelişim evresi süresince sürekli artış göstererek vücut hücreleri arasında en büyük hücreler haline gelir [131]. Çalışmamızda da trofositlerin boyutlarına ilişkin ölçümler, beslenme döneminde sürekli artış gösteren hücrelerin en yüksek boyutlara pupal safhanın 0. günü ulaştığını göstermektedir. Bugünden itibaren azalmaya başlayan hücre boyutları, total protein miktarı ile aynı yönde değişim göstermektedir. Bu durumda depo maddelerinin önemli bir kısmının protein olduğu ileri sürülebilir. Protein absorpsiyonu doğrudan hücrelerin artan hacimleri ile ilişkilidir [131]. Protein miktarındaki değişim

benzer şekilde hücre sitoplazmasının hacminin dolayısıyla, boyutlarının değişimine de yansımaktadır.

Larval safhalar ile karşılaştırıldığında pupa ve erginlerin vücut kütlelerinde daha düşük nispi su içeriğine sahip olduğu bulgusuna dayanarak, erginlerin besin ve enerji kaynağı olarak yalnızca yağ kullanmakta olduğu tespit edilmiştir. Çünkü yağ depolanma işlemi, protein ve karbonhidrat depolamak için gerekenden daha az metabolik suya gereksinim duymaktadır [124]. Metamorfozda geç larval safhalarda, yağ dokudaki sitoplazmik bileşenler, gelişecek imaginal dokuların gelişiminde kullanılmak için otofaji ile yıkıma uğratılmaktadır. Açlık ise yağ doku hücrelerinin morfolojisinde lipid damlacıklarının birleşmesi ve besin maddelerinin mobilizasyonu gibi birtakım değişimleri tetiklemektedir. Tüm bu değişimlerin bir sonucu olarakta yağ doku hücrelerinin boyutlarında bir azalma meydana gelmektedir [45]. Bu verileri destekleyici nitelikte pupada özellikle son günlerine doğru büyük yağ vakuollerinin protein ve karbonhidrat olduğu düşünülen granül ve inklüzyonlardan çok daha geniş alanlar kapladığı, histolojik kesitlerde ve elektron mikroskobu incelemelerinde gösterilmiştir. Böceklerde uçuş için gereken enerji yağdan karşılanmaktadır. Pupal safhanın sonunda kalan hücrelerden yağ vakuolü olduğu düşünülen yapılar hücrenin geneline oluşturmaktadır. *Galleria mellonella* güve kelebeklerinin hem uçtuğu hem de beslenmediği düşünülecek olursa, ergin yaşamı için gereken enerjinin trofositlerde depolanan yağlar tarafından karşılandığı anlaşılmaktadır. Pupal gelişim için gerekli enerjinin en önemli kısmı ise depo karbonhidratlardan elde edilmektedir.

Holometabol böceklerin çoğu besinler yoluyla elde ettikleri aminoasitleri yağ doku hücrelerinde depo proteinlerine dönüştürerek hemolenfe salar. Larval dönemde yağ doku hücrelerinin gerçekleştirdiği bu faz protein sentez fazıdır [131]. Trofositlerde depolama amaçlı protein birikimi gözlenmezken, hemolenf üretilen depo proteinlerinin birikiminin gerçekleştiği temel yapıdır. Son larval evrede depo proteinlerin hemolenfteki birikimleri artış gösterir [10].

Yağ doku hücrelerinde son larval safhanın başlangıcında birkaç protein granülü olduğu düşünülen elektronca yoğun yapılar haricinde vakuol yapısına rastlanmamıştır (Şekil 4-10f). Canlılık faaliyetlerinin devam ettiği hücrelerde bulunan mitokondri ve endoplazmik retikulum yapıları ise larval safhanın başlarında fotoğraf üzerinde

gösterilmiştir (Şekil 4-8a). Larval safhanın ilerlemesi ve özellikle gezinme ve örme davranışının gözlenmesiyle birlikte trofositlerde vakuoler yapıların arttığı hem kontrol hem de fenoksikarb uygulama grubunda tespit edilmiştir (Şekil 4-12c, d).

Sitosölde görülen zar katlanmaları (Şekil 4-12d), membranların geri dönüşümü ile ilişkilidir. Tirozin içeren vakuollerin paketlenerek hemolenfe salıverilmesinin ardından çok miktarda membranın yağ dokuda görüldüğü belirtilmiştir [131]. Sentezlenen depo materyallerinin hemolenfe salınması, hemolenften absorbe edilmesi membranların paketler oluşturmasını gerektirmektedir. Kullanılan ve görevi sonlanan plazmik membranların geri dönüşümü nedeniyle zar katlanmaları sitosölde görülmektedir. Çalışmamızda özellikle gezinme ve örme davranışının gözlendiği dönemde bu yapılara rastlanmıştır. Hemolenfte artış gösteren ekdizona bir yanıt olarak hemolenfte depo edilen materyallerin yağ doku hücreleri tarafından absorbe edildiği düşünülecek olursa, membran geri dönüşümünün bir sonucu olan zar katlanmalarının sitosölde görülmesi beklenen bir durumdur.

Müller et al., [14], *Manduca sexta* yağ dokusunda sindirilmeyen kalıntıların TEM görüntülerinde koyu, elektronca yoğun ve homojen noktalar ya da lekeler olarak otofajik vakuoller içerisinde kaldığını belirtmektedir. Çalışmamızda sindirilmeyen kalıntıların pupal safhanın sonunda heterojen görünümlü, elektronca yoğun yapılar olarak görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4-20; 4-21). Özellikle pupal safhanın ilerleyen günlerinde artan vakuolizasyonun sekonder lizozomlar ve içerisinde birikim gösteren lipofuksin granülleri olduğu tespit edilmiştir. Lipofuksin granülleri elektronca yoğun vakuoller içerisinde daha açık yoğunlukta bölgelere sahiptir. Sindirilemedikleri için otolizozomlar içerisinde biriktikleri görülmüştür.

Pupal safhanın 6. günü elde edilen TEM görüntülerinde büyük lipid vakuolleri arasına sıkışmış nükleus ve yine vakuoller arasında ince hatlar halinde sitoplazmik bölgeler seçilmektedir (Şekil 4-20; 4-21). Sitoplazmik alanlarda hâkim olan yapı ise otolizozomlardır. Hücrelerde sitoplazmik alanların kısıtlanması ve bu bölgelerin yoğun olarak lipofuksin pigmentleri içeren lizozomları bulundurması, aktif hücrenin belirteci olan mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerin sitoplazmik bölgede bulunmayışı, hücrelerin yaşam faaliyetlerinin son aşamasında olduğunu düşündürmektedir.

4.2.4. Total Protein Miktarı Değişimleri

Larval safhanın sonunda trofositlerde protein sentez fazının sona ermesi ile az miktarda, hücre gereksinimlerini karşılayacak metabolik sentezlerin gerçekleştiği görülür. Larva pupalaşmaya hazır olduğunda protein sentezi kesilir. Bu prepupal dönem süresince lizozomik aktivite ile larval evrelerde biriktirilen rezervlerin güçlü şekilde yıkımının gerçekleştiği bildirilmektedir. Bu yıkımlar sonucu oluşan ürünler ise ergin dönüşümü için pupal ihtiyaçları karşılayan kaynak olarak görev alacaktır [131].

Kontrol grubunda son larval evrede ve fenoksikarb uygulaması gerçekleştirilen grupta görülen ekstra larval evrede, larva beslenmeden kesilinceye kadar (K0-S1; 8-0, 8-8) vücut ağırlıklarında görülen artışa paralel olarak total protein miktarında devamlı bir artış belirlenmiştir. Larval yağ doku hücreleri tarafından depo proteinlerin sentezi beslenme aktivitesiyle ilişkilidir [132]. Total protein miktarı incelendiğinde S3'te istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Benzer şekilde 5 µg fenoksikarb uygulama grubu larvalarının 8-S3'te tespit edilen total protein miktarı artışının kaynağının hemolenf depo proteinlerinin absorpsiyonu olduğu düşünülmektedir. *Calpodes ethlius*, *Drosophila melanogaster* ve *Pieris brassicae*'de yağ doku tarafından proteinlerin sentezi ve absorpsiyonunun hormonal kontrol altında gerçekleştiği ve bu süreçlerde etkili olan faktörün özellikle ekdisteroidler olduğu tespit edilmiştir [133].

HE ile boyanan histolojik kesitlerde kontrol ve uygulama gruplarında trofositlerde sitoplazmik granüller eozin ile pozitif reaksiyon vermiştir. Hücreler yeni larval evrenin ilk günlerinde her iki grupta da homojen bazofilik özellik sergilese de özellikle ekdizon salınımının gerçekleştiği S3 ve 8-S3'te eozin ile boyanan granüller belirlenmiştir. Aynı dokunun farklı gelişim günlerinde farklı boyanma özellikleri sergilemesinin temel nedeni doku bileşenlerinin değişmesidir. Özellikle ekdizon salınımının gerçekleştiği S3 ve 8-S3'te hem kontrol hem de uygulama grubunda eozinofilik granüllerin artış göstermesi, ekdizon salınımının yağ doku hücrelerinde madde depolamayı tetiklediği yönünde kanaat oluşturmaktadır.

5 µg fenoksikarb uygulamasının ardından geçen dört günlük 7. instar periyodunda yağ doku total protein miktarında artış belirlenmiştir. Larvaların larval-larval deri değişimine hazırlandığı "G" ile sembolize edilen gelişim döneminde, total

vücut ağırlığında görülen azalışa karşın yağ doku total protein miktarındaki artış 20HE'nin hemolenfteki proteinlerin yağ doku hücreleri tarafından larval deri değişiminde de absorbe edilmesine neden olduğunu düşündürmektedir. Nagata and Kobayahi [132] depo proteinlerin miktarının larval deri değişimi veya açlık süresince artmadığını var olan depo proteinlerin aminoasitlere yıkılarak larval deri değişiminde gerekli olan yapılarda kullanıldığını ya da karbohidrat yetersiz ise enerji kaynağı olarak kullanıldığını vurgulamaktadır. Ayrıca yaptıkları bir diğer çalışmada yağ dokuda depo proteinlerinin miktarının beslenme süresince düşük iken deri değişimi sırasında arttığını, hemolenfte ise durumun tam tersinin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir [134]. Dolayısıyla yağ dokunun protein içeriğinin artmasındaki temel nedenlerden bir tanesinin hemolenfte depo edilen proteinlerin metabolize edilmek üzere tekrar yağ doku hücreleri tarafından alınması olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra deri değişimine hazırlanan böceklerde, trofositlerde sentetik aktivitenin arttığı bilinmektedir [42]. DNA nükleer bölünme olmaksızın kendini replike eder ve hücreler poliploid olur. Aynı zamanda RNA sentezi ve ribozomların sayılarında, mitokondri ve granüllü endoplazmik retikulumda artış meydana gelir. Larval yağ doku hücresi mitoz bölünme geçirerek hücre sayısını artırır ve yeni larval evreye hazır hale gelir. Bu durumda temel ihtiyaçlar da iki katına çıkacaktır. Hücre bölünmesi için yağ dokunun ihtiyacı olan temel gereksinimleri artacağından sentezlediği enzim ve protein de artış gösterecektir. Bu durumun dokunun total protein miktarında artışın nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir.

Kontrol grubunda beslenmenin gerçekleştiği son larval dönemde yaklaşık 3,5 gün boyunca yağ dokuda total protein miktarı artış göstermiştir. Larvaların beslenmeleri sonucu artan vücut hacmi ve boyutları göz önünde bulundurulduğunda ve literatür araştırmalarından sentetik fazda olduğu bilinen hücrelerde büyüme ve gelişmenin gerçekleşmesi için organik moleküllerin sentezi ve miktarlarındaki artışın doğal bir sonucu, total protein miktarının da artışıdır. Holometabol böceklerde bağırsak boşalması ekdizona bağımlı olup, hemolenfteki ekdizon pikinin bir indikatörü olarak kabul görmektedir [135]. Gerçekleşen ekdizon piki ile beslenmeden kesilen larvaların prepupal gelişim evrelerinde (S1-S5), özellikle S3 evresinde yağ doku hücreleri total protein miktarlarında istatistiksel olarak da anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Total vücut ağırlıklarında istatistiksel anlamda önemli derecede düşüş görülürken, yağ doku total protein miktarında istatistiksel olarak anlamlı artış dikkat

çekmektedir ($p < 0,05$). Histolojik kesitlerde eozinofilik boyanmada dikkat çekici şekilde artmış, trofosit boyutları $19 \mu\text{m}$ 'den kontrol grubunda $46 \mu\text{m}$ 'ye, uygulama grubunda $47 \mu\text{m}$ 'ye kadar ulaşmıştır. Bu artışın temel nedeninin, beslenme faaliyetinin olmadığı prepupal dönemde, hemolenfte depo edilen proteinlerin yağ doku hücreleri tarafından absorbe edilmesi olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda bu yönüyle mevcut literatür bilgilerini destekleyici sonuçlar elde edilmiştir. Pupal deri değişiminden hemen önce hemolenfte pik değerine ulaşan 20HE yağ doku tarafından hemolenfteki protein depolarının absorpsiyonunu tetikleyici faktördür. Aynı dönemde hemolenfte yükselen JH ise trofositlerde protein sentezini baskılayıcı faktörü oluşturmaktadır [133]. Lepidopterlerde yapılan benzer çalışmalarda ekdizonun pupal dönem ve öncesinde hemolenf proteinlerinin yağ dokuya taşınmasını tetikleyici faktör olduğu belirtilmiştir [129, 136]. Hemolenfte depo edilen proteinler prepupal dönemde gerçekleşen ekdizon piki ile yağ doku hücreleri tarafından absorbe edilir ve pupal dönemde metabolize edilmek üzere depolanır [10]. Yağ dokunun sentez aktivitesinin düşük seviyelere indiği bu faz dinlenme fazı olarak isimlendirilir [131]. Depo proteinlerinin yağ doku hücrelerinde hidrolize edilmesi sonucu aminoasitler oluşur. Elde edilen aminoasitler ergin gelişimi için gereken doku ve organların yapılandırılmasında kullanılır ve tüm bu süreçler hormonal kontrol altında gerçekleşir [10].

Yağ doku depo proteinlerinin sentezi kesilse de bahsedildiği gibi metabolizma ihtiyacı moleküllerin sentezi trofositlerde devam etmektedir. Örneğin, kitin hidrolizinde aktif görev alan β -N-asetilglukozaminidaz enzim sentezi prepupal dönemde gerçekleşmektedir. Enzimin sentezini tetikleyen esas faktör 20HE salınımıdır. Bunun yanı sıra polipeptit yapıdaki imajinal disk büyüme faktörleri gibi imajinal hücrelerin gelişimini tetikleyen; aynı zamanda programlanmış hücre ölümünde rol alarak ipek bezi dejenerasyonunda eksprese olduğu tespit edilen moleküller yine metamorfoz sürecinde sentezlenmektedir. Metamorfoz sırasında gerçekleşen ekdizon piki çeşitli doku ve organlarda programlanmış hücre ölümünde görev alan birçok enzimin sentezini tetikleyici bir faktördür [137]. Söz konusu moleküllerin sentezinin yine yağ doku total protein miktarındaki artışa katkısı olacağı düşünülmektedir.

Pupal deri değişiminin gerçekleşmesiyle, koza içerisinde tamamlanacak olan, gaz değişimi dışında madde alışverişinin olmadığı ortalama 7 günlük bir dönem başlar. Bu süreç içerisinde protorasik bez, ipek bezleri, larval orta bağırsak gibi artık fonksiyonunu yitiren larval yapılar programlanmış hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılırken, kök hücrelerden pupal orta bağırsak ve yağ doku, kanat, torasik bacak, üreme yapıları gibi ergin yaşamda fonksiyonel doku ve organlar şekillenir. Ergin doku ve organlarının yapılandırılması için gereken yapı taşları ve enerji ihtiyaı, dejenere olan doku ve organların yanı sıra depo edilen materyallerden sağlanır.

Tüm bu 7 günlük süreçte hem kontrol hem de 5 µg uygulama grubu pupalarında vücut ağırlıklarında belirlenen azalmaya paralel olarak periviseral yağ doku total protein miktarında da azalma meydana gelmiştir. Söz konusu günlere ilişkin histolojik preparatlar incelendiğinde, hücrelerin materyal içeriğinde meydana gelen azalma literatür verilerini destekler niteliktedir. Ergin doku ve organların yapılanmasında gerekli proteinlerin sentezinin, dişilerde yumurta depo proteinlerinin özellikle vitellogeninin üretilmesinin, yağ doku protein rezervlerinin yıkımı ile karşılandığı mevcut literatürlerde belirtilmiştir [53]. Pupal evre süresince azalış gösteren total protein içeriğinin ergin dönüşümü ve canlılığın sürdürülmesi için gerekli metabolik ihtiyaçlar için kullanıldığı bilinmektedir.

4.2.5. Yağ Dokuda Programlanmış Hücre lm

Yağ dokunun metamorfoz süresince geçirdiği, yeniden şekillenme olarak adlandırılan tüm değişimleri, programlanmış hücre ölümü özellikleri açısından yaklaşılarak *Manduca sexta* [14], *Bombyx mori* [7, 10, 11, 12, 56, 60, 92, 138], *Helicoverpa zea* [13] gibi lepidopterlerde ve dipterlerden özellikle *Drosophila melanogaster* [10, 56, 61, 139]'de detaylı çalışılmıştır.

Manduca sexta'da yağ dokuda son larval safhanın 4. gününden pupal safhaya kadar yağ dokusunda yapılan incelemelerde, apoptotik hücre ölümüne ilişkin tek bulgu TUNEL pozitif hücrelerin yoğunluğu olmuştur. Larval safhanın sonunda gezinme ve örme davranışının gözlemlenmesiyle yüksek oranda TUNEL pozitif nükleus belirlenmiştir. DNA fragmentasyonunun, DNA jel elektroforezi ile de desteklendiği çalışmada yürütücü kaspazların (kaspaz 3, 6, 7) larval yağ doku hücrelerinde dejenere süreçlerine katılıma ilişkin kanıt bulamamışlardır. Zakeri et al., [140]

DNA fragmentasyonunun otofajik hücre ölümünde rastlanan bir durum olduğunu belirtmiştir. TEM incelemelerinde ve asit fosfataz enzim aktivitesi ölçümlerinde morfolojik ve biyokimyasal açıdan otofajik hücre ölümünün gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. 20HE, *Manduca sexta* yağ dokusunun yeniden şekillenme sürecinde rol alan otofajiyi başlatan esas faktördür [14].

Helicoverpa zea'da yağ dokunun, bulunduğu bölgeye spesifik olarak dejenere olduğu tespit edilmiştir. Periferal yağ doku pupal safhanın ilk günlerinde sitosölde artış gösteren otofajik vakuollerce uzaklaştırılırken periviseral yağ dokunun hücre içinde artış gösteren otofajik vakuollere rağmen pupal safha süresince varlığını sürdürdüğü tespit edilmiştir [13].

Bombyx mori'de yapılmış birden çok çalışma mevcuttur ve bu çalışmalar programlanmış hücre ölümünün başlangıç zamanı hakkında birbirleriyle çelişmektedir. Kaneko et al., [7] pupanın 1 ve 2. günlerinde *Bombyx mori* yağ dokusunda kaspaz enzim aktivitesinin varlığını spektrofotometrik ve immunoblotting yöntemlerle göstermiştir. Yaptıkları çalışmada agaroz jelde belirledikleri DNA kırıklarının ve yoğun TUNEL pozitif reaksiyonun artan kaspaz 3 enzim aktivitesi ile eşzamanlı olduğunu da göstererek, larval yağ dokuda yeniden yapılanma süreçlerini apoptotik açıdan incelemişlerdir. PHÖ'nün pupalaşmanın ardından P1 ve P2'de yağ dokunun %30'luk kısmında gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 20HE'nin in vivo ve in vitro olarak programlanmış hücre ölümünü başlatan faktör olduğunu belirtmişlerdir. Korpora allatanın çıkarılmasına ilişkin denemelerde ise JH'nun yağ dokunun yeniden şekillenme süreçleriyle ilgisi bulunmadığını ileri sürmüşlerdir. Gui et al., [11] ve Lee et al., [91] çalışmalarında PHÖ'nün son larval instarın ortalarında başladığını ileri sürerken; Kaneko et al., [7] yağ dokunun üstlendiği görevler gereği dejenerasyonun son larval instarda olmasının mümkün olmadığını, dejenerasyon süreçlerinin pupalaşmadan hemen sonra başladığını ileri sürmektedir.

Sumithra et al., [60] tarafından *Bombyx mori* periferal yağ dokusunda yapılan çalışmada otofajik yıkım ile yağ doku hücrelerinde programlanmış hücre ölümünün gerçekleştiği ve 20HE'nin süreci başlattığı bildirilmiştir. Periferal yağ dokuda PHÖ prepupal dönemde gerçekleşmektedir. Gezinme ve örme davranışının ikinci günü trofositlerde otofagozomların belirlendiği ve bunun hücrelerin PHÖ süreçlerini

kabullendiklerinin göstergesi olduğu da aynı çalışmada belirtilmiştir. Trofositlerde otofajik hücre ölümünün gerçekleştiğini bildirenler de kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gibi erken apoptotik hücre ölümü özelliklerinin de gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

Bombyx mori periviseral yağ dokusunda gerçekleşen yeniden şekillenme süreçlerinin ise pupal safhada gerçekleştiği bildirilmiştir. Apoptotik ve otofajik hücre ölümü açısından yapılan çalışmada DNA'da kromatin yoğunlaşmasının pupal safhanın 5. gününde, DNA fragmentasyonunun ise 6. günde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Yine 5. günde otofagozom oluşumu gözlemlendiği, 6. günde ise lizozomlarla birleşerek otofajik vakuolleri oluşturdukları elektron mikroskobu ile belirlenmiştir. Asit fosfataz enzim aktivitesinin P5 ve P6'da en yüksek seviyeye ulaştığı, ardından ise düşüşe geçtiği belirtilmiştir [12].

Tian et al., [92], *Bombyx mori*'de son larval instar ve prepupal süreçte larval yağ dokunun geçirdiği yeniden şekillenme süreçlerini apoptotik özellikler bakımından incelemişlerdir. 5. deri değişimi ve prepupanın 1., 2. günü süresince 20HE'nun başlattığı apoptotik hücre ölümü görülmektedir. Araştırmacılar bu kanıya DNA fragmentasyonunu belirleyerek ulaşmışlardır. Gui et al., [11] ise 5. instarın 3. günü ile prepupanın 2. günü arasında geçen dönemde agaroz jel elektroforezinde *Bombyx mori*'de DNA fragmentasyonunu belirlemişlerdir. Tian et al., [92], *Bombyx mori*'de beslenme süresince ekspresyonu çok düşük olan ancak 20HE ile özellikle bu günlerde ekspresyon seviyeleri artan apoptotik genlerin (Apaf-1, Nedd 2 like 1, Nedd 2 like 2, ICE1-3-5, Arp, IAP) ekspresyonlarının da arttığı sonucunda varmışlardır. 20HE'nun yağ dokuda gerçekleşen apoptozisi transkripsiyonel seviyede düzenlediğini ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar bu düzenlemeyi EcR ve USP ile oluşturdukları aktif reseptör kompleksiyle gerçekleştirdiklerini vurgulamışlardır.

Aynı araştırmacıların bir diğer çalışması da *Bombyx mori*'de 20HE'nun yine EcR ve USP ile oluşturduğu aktif kompleks ile ATG genlerinin (ATG 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 18) ekspresyonunu uyararak ve PI3K-TORC1 yolunu inhibe ederek otofajiyi başlattığını göstermiştir. Yine son larval deri değişimleri ve prepupal dönemde asit fosfataz enzim aktivitesinin artışı ve otofagozomların oluştuğunu tespit

etmişler; bunun sonucu olarakve yağ dokunun yeniden şekillenme sürecinde apoptoza otofajinin eşlik ettiğini bildirmişlerdir [138].

Liu et al., [10] *Bombyx mori* ve *Drosophila melanogaster* yağ dokusunun yeniden şekillenme süreçlerinde geçirdiği değişimleri karşılaştırmalı olarak incelemiştir. *Drosophila melanogaster*'de örme davranışının başlamasıyla yağ doku hücrelerinde başlayan ve aşamalı olarak gerçekleşen programlanmış otofajinin olduğunu, larval hücrelerin pupal safha süresince böceğin vücudunda kaldığını ve henüz beslenmeyen genç erginde programlanmış hücre ölümü ile ortadan kaldırıldığını bildirmişlerdir. *Bombyx mori*'de ise larval-pupal dönüşüm sırasında yağ doku hücrelerinin birbirinden ayrıldığını ve aşamalı olarak apoptotik ve otofajik hücre ölümü ile pupal safha boyunca programlanmış hücre ölümü geçirdiğini tespit etmişlerdir.

Drosophila melanogaster yağ dokusunun yeniden şekillenmesinin metamorfozun erken safhalarında prepupal dönemde başladığı belirtilmektedir. Bu süreç gerçekleşen 20 HE piki ile larval yağ dokunun bireysel yağ hücrelerine ayrılması ile başlar [61]. Bu hücreler hemosölde pupal dönem süresince kalır. Yeni erginde bulunan larval yağ doku hücre sayısı erginin açlık ile hayatta kalım savaşında enerji kaynağı olarak büyük öneme sahiptir [63] ve genç erginde programlanmış hücre ölümü ile ortadan kaldırılırlar [61, 63]. Otofajinin erken gezinme ve örme davranışı ile birlikte trofositlerde başladığı ve aşamalı olarak devam ettiği bildirilmiştir [10]. Ergin yağ dokusu ise muhtemelen larval vücut duvarına gömülü imajinal diskler ile ilişkili epitelial kök hücrelerden farklılaşarak oluşur. Larval yağ doku hücrelerinin ortadan kaldırılması metamorfoz süresince otofaji ile ilişkilidir. Bu hücrelerin yaşlı ergindeki son yıkımı ise kaspaz kaskadı ile gerçekleşen apoptotik hücre ölümü sonucu olur [63]. Bu süreçte ilk olarak otofajinin gerçekleşmesinin, trofositlerin hayatta kalmasının yolunu açtığı ve metabolizmadaki fonksiyonlarını yerine getirmesine fırsat tanıdığı görüşü de ileri sürülmektedir. Buna ilişkin olarak otofajinin inhibe edilmesinin bu hücrelerde doğrudan apoptotik hücre ölümünü başlattığı ve pupal safhada böcek ölümlerinin meydana gelmesine neden olduğu bildirilmiştir [56].

Çalışmalar lepidopterlerde farklı ordolara ait türler arasında farklılıklar olmasının yanı sıra, aynı ordoya dâhil farklı türler arasında da zamanlama ve

mekanizmaların sürece dâhil oluş aşamasında farklılıklar olduğunu göstermektedir. *Galleria mellonella* yağ dokusunda ise bu konuda şu ana kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda, *Galleria mellonella*'da yağ dokunun yeniden şekillenmesinde rol oynayan programlanmış hücre ölümü, apoptotik ve otofajik açıdan ayrıntılı olarak aşağıda ayrı ayrı tartışılmıştır.

4.2.5.1. Apoptoz

Yağ doku morfolojisi ve böcek fizyolojisindeki görevinin gereklilikleri açısından son derece vakuol ve granül içeren bir yapıya sahiptir. Larvaların beslenmesi ve depo materyallerin sitoplazmik inklüzyonlar ve vakuolar yapılarca biriktirilmesi nedeniyle morfolojik değişimleri programlanmış hücre ölümü karakteristikleri açısından değerlendirmek zordur. Bu nedenle HE ve PAS ile boyanan preparatlarda DNA fragmentasyonuna, apoptotik hücre özellikleri taşıyan hücrelere ilişkin (hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanase olması ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi) ya da otofajiye spesifik otofajik vakuoller gibi özelliklere ilişkin tespit yapılamamaktadır. Histolojik preparatlar detaylı incelense de apoptotik hücre ölümü açısından değerlendirilememiştir. Elektron mikroskobu incelemeleri projede öncelikli olarak otofajik vakuollerin belirlenmesi amacıyla yapılmış olsada, nükleer morfoloji, gelişimin hiçbir aşamasında apoptotik hücre ölümü karakteristiği sergilemediği gibi, apoptotik hücre ölümüne spesifik hücre morfolojileri (nükleer fragmentasyon, nükleer apoptotik cisimler gibi) yapılan incelemelerde görüntülenmemiştir.

Apoptozun en önemli belirteci olan 180-200 baz çiftlik DNA kırıklarının gösterilmesi amacıyla kullanılan TUNEL tekniği sonuçlarına göre yağ dokuda DNA kırıklarının oluşumu son derece azdır. Yalnızca pupanın 3. güne ait kontrol grubu kesitlerinde sahada bir adet nükleus bölgesinde TUNEL pozitif hücreye rastlanmıştır. Dokunun genelinde DNA fragmentasyonu yoktur. Oysaki *Bombyx mori* ve *Manduca sexta* yağ dokusunda TUNEL pozitif hücrelerin yoğunluğunun arttığına ilişkin çalışmalar mevcuttur [7, 12, 14, 60]. TUNEL yönteminin uygulandığı günlere ait kaspaz 3 enzim aktivitesi bulguları, periviseral yağ dokuda kaspaz 3 aktivitesinin olduğunu tespit etmiştir. Kaspaz 3 aktivitesi, pik değerine kontrol ve fenoksikarb uygulama gruplarında, pupal safhanın ortasında (P3, 8-P3) ulaşmış ardından tekrar düşüş eğilimi sergilemiştir. *Bombyx mori*'de belirlenen DNA fragmentasyonuna artan

kaspaz 3 enzim aktivitesi eşlik ederken [7], *Manduca sexta*'da kaspaz enzim aktivitesi DNA fragmentasyonuna rağmen belirlenememiştir [14].

Kamalidehghan et al., [141] yaptıkları in vitro çalışmada insan karaciğer hepatoselüler karsinom hücrelerinde DNA fragmentasyonu olmaksızın, kaspaz 3'ü tespit etmişlerdir. Bu çalışmayı in vitro hücre hatlarında, bazı hücrelerin DNA fragmentasyonuna ihtiyaç duymadan ortadan kaldırılabilirdiğini, aktif kaspaz 3'ün tespit edildiği bu tip hücre ölümünün de apoptotik hücre ölümü olarak değerlendirilebileceğini ileri sürmektedirler.

Apoptotik hücre ölümünde, ölen hücre kısımlarını içeren apoptotik cisimler fagositlerce tanınarak sindirilir. Memeli dokularında makrofajlar ve nötrofiller hızlıca apoptotik hücreleri fagosite edebilme yetisine sahiptirler. DNA fragmentasyonunun fagosite edilmek için ölen hücrelerin bir markırı olduğu ileri sürülmektedir. Ancak farede kaspaza-direçli ICAD eksprese eden apoptotik hücrelerde DNA fragmentasyonu görülmezken, fagositler tarafından normal hücreler gibi başarılı bir şekilde fagositoza uğradıkları tespit edilmiştir. Apoptotik hücre ölümünün diğer özelliklerini gösteren bu hücrelerde, DNA fragmentasyonun ölen hücrenin fagosite edilebilmesinin bir ön koşulu olmadığı, fragmentasyon olmamasının fagositozu engelleyen bir faktör olmadığı, apoptozu engellemediği ileri sürülmüştür [37]. Sonuç olarak hücre programlanmış hücre ölümü sinyalini aldıysa DNA fragmentasyonu olmasa da ortadan kaldırılabilir.

TUNEL kesitlerinin görüntülenmesi sırasında yeşil yüksek arka plan ışması problemi ile karşılaşmıştır. Bu durumun üstesinden gelmek için proteinaz K ile kimyasal muamele süresi 20 dakikadan 45 dakikaya uzatılsa da sonucu değiştirmemiştir. Spesifik olmayan bu ışmaların nedeni TEM incelemeleri sonucunda anlaşılmıştır. Elektron mikroskobu görüntülerinde pupal safhanın geç dönemlerinde sitoplazmada karşılaşılan elektronca yoğun granüllerdeki heterojen görünümün nedeninin lizozomlarda birikim gösteren lipofuksin pigmenti olduğu tespit edilmiştir. Lipofuksin, hücre içinde birikim gösteren yaşlanma ile ilişkili pigmenttir. Post mitotik ve yavaş bölünen hücrelerde sekonder lizozomlarda birikim gösterir. Esas itibarıyla demir katalizli oksidatif reaksiyonlardan dolayı oluşmuş çapraz bağlı protein

artıklarından oluşur. Çözünürlüğü olmadığı gibi eksositoz yoluyla da atılmadığından hücrelerde birikimi kaçınılmazdır [142].

Lipofuksinin fosfatidiltehanolamin (A2E-PE) molekülü en önemli yapısal özelliklerinden biri yapısında fluoropor bis-retiniliden içermesidir. Bu molekül lipofuksine otofloresan madde olma özelliği kazandırır. Bu sayede lipofuksin granülleri floresan mikroskopta ve lazer tarama mikroskobunda boya kullanmaksızın görüntülenebilmektedir.

Drosophila melanogaster'de anterior bölgede bulunan yağ hücrelerinin metamorfozda otofloresan ışımaya yaptığı belirtilmiştir ancak, nedeni hakkında herhangi bir bilgi verilmemiştir. [61]. Yine *Bombyx mori* yağ dokusunda prepupal dönemin ikinci günü DAPI boyamada bütün halde bulunan nükleus yapısına rağmen TUNEL boyamanın sitoplazmaya difüze olduğu şeklinde ifade kullanılmıştır [92].

Lipofuksin granüllerinin otofloresan özelliğinin floresan ve immunofloresan çalışmalarda bazı güçlüklerle ve yanlış değerlendirmelere neden olabileceği çeşitli canlılarda ve dokularda bildirilmiştir [143, 144, 145]. Sıçan hipokampus dokusuna ait TUNEL preparatlarında çalışmamızda olduğu gibi yüksek arka plan ve sitoplazmik bölgelerde spesifik olmayan ışımaya bölgeleri görülmüştür. Bu ışımaya nedeni olarak dokunun içerdiği lipofuksin granüllerinin otofloresan özelliği gösterilmiş, sorunun üstesinden gelmek amacıyla çalışmamızda da olduğu gibi DAPI ile karşıt boyama gerçekleştirilmiştir. FITC ve lipofuksin kaynaklı ışımaya bölgeleri DAPI ile nükleer ışımaya yaptığı bilinen bölgeler karşılaştırmalı incelenerek sorunun üstesinden gelinmiştir [145].

Çalışmamızda TUNEL analizi sonuçlarına göre yağ dokuda birikim gösteren vakuolar yapılarıdaki ışımaların varlığı ve bu ışımaların lizozomlarda birikim gösteren lipofuksin kaynaklı olduğu TEM sonuçları ile de tespit edilerek desteklenmiştir. Larval ya da pupal yağ dokunun kontrol veya fenoksikarb uygulama grubunda apoptotik hücre ölümünün morfolojik özelliklerinden bir tanesi olan DNA fragmentasyonunun ise dokuyu yeniden şekillendirme süreçlerinde etkili olamayacak kadar önemsiz olduğu düşünülmektedir.

4.2.5.2. Otofaji

Otofaji, besin kıtlığı dönemlerinde, canlının hayatta kalması için gerekli olan metabolik faaliyetlerin devamlılığını sağlayan mekanizma olarak görev yapar [44, 146]. Postembriyonik gelişim dönemlerinde, juvenil safhadan ergin safhaya geçerken büyük değişiklikler yaşayan, özellikle de metamorfoz geçiren hayvanlarda ise türe özgü bir takım doku ve organların vücuttan uzaklaştırılması amacıyla programlanmış hücre ölümü rolünü üstlenir. Hücrenin sağkalımını düzenleyen otofaji ve hücrenin ölümüne neden olan otofajik hücre ölümü arasındaki ilişkiyi düzenleyen mekanizmalar ise henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Hücresel boyutta bakıldığında hücreyi ölüme götüren bir mekanizma olsada, çok hücreli canlılarda besin maddelerinin yıkılarak tekrar kullanılabilmesine ve canlının hayatta kalmasına katkıda bulunan bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir [146].

Otofajiyi düzenleyen steroid ve büyüme faktörü sinyal yolları, ATG genleri ve bu genlerin düzenleyicileri böceklerde ve insanlarda benzerdir [146]. Memeli sistemlerine nazaran model organizmalardan *Drosophila melanogaster*'in sahip olduğu daha az sayıda gen bölgesi çalışmalarda değişkenlerin azalmasını sağlarken kısa hayat döngüsü sonuçların daha hızlı elde edilmesi açısından büyük avantaj sağlamaktadır [147]. Otofajinin en iyi tanımlandığı canlı grubu böceklerdir. Özellikle *Drosophila melanogaster*'de in vivo da yapılan çalışmalar ile otofajiye ilişkin sonuçlar elde edilebilmektedir.

Böceklerde yağ doku otofajinin düzenlenme mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar için çok uygun bir materyaldir. Bu nedenle otofaji ve otofajik hücre ölümü mekanizmaları, aralarındaki ilişki ve geçişin düzenlenmesine ilişkin araştırmalar lepidopter böceklerde sıklıkla yağ dokuda gerçekleştirilmektedir. *Drosophila melanogaster* ve yağ dokusu bahsedildiği gibi çalışmaların sıklıkla gerçekleştirildiği materyaldir. Diğer holometabol böceklerde yapılan çalışmalar sürecin aynı ordoya dâhil türlerde dahi farklı zamanlarda gerçekleşebileceğini ortaya koyarken elde edilen tüm veriler omurgalı sistemleri ile birlikte değerlendirildiğinde otofaji ve otofajik hücre ölümü üzerine aydınlatıcı bulgular elde edilebilmektedir.

Özellikle periviseral yağ doku larval ve pupal safhalarda, ilerleyen gelişim safhaları için gereken besinlerin depolandığı esas organdır. *Helicoverpa zea*'da

periviseral yağ dokunun ergin yağ dokusunun öncüsü olduğu tespit edilmiştir [13]. *Drosophila melanogaster*'de benzer şekilde larval yağ doku hücrelerinin ergin döneme kadar canlı kaldığı, ergin dönemin ilk üç gününde programlanmış hücre ölümü ile ortadan kaldırıldığı görülmüştür [61]. Her iki lepidopterde de beslenmenin gerçekleşmediği dönemde artan otofajik karakterlerin dokunun ergin yağ dokusuna yeniden şekillenmesinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır [13, 61]. Benzer şekilde *Manduca sexta* ve *Bombyx mori* yağ dokusunda otofajik hücre ölümü karakteri olan otofajik vakuollerin tespit edildiği, *Bombyx mori*'de asit fosfataz enzim aktivitesinde artış gösterdiği, periferal yağ dokunun otofajik hücre ölümü ile larval-pupal metamorfozda artan ekdizon sinyali ile dejenere olduğu vurgulanmıştır [12, 14, 60]. Tüm bu çalışmalarda genel anlamda otofaji ve otofajik hücre ölümünün yağ dokunun yeniden yapılanmasında rol üstlendiği anlaşılmaktadır, ancak otofaji mekanizmasının sürece dahil oluşu ve yoğunluğunun türden türe farklılık gösterdiği, bu süreçte apoptotik hücre ölümüyle olan ilişkisinin farklı düzeylerde gerçekleştiği sonucu da çıkmaktadır. Hepsinin lepidopter olduğu düşünülecek olursa bu farklılıkların hangi nedenlerden ileri geldiği henüz anlaşılamamıştır.

Holometabol böceklerde birçok doku ve organ yeniden şekillenme sürecine girer veya dejenere olur. Otofajinin yalnızca yağ dokunun yeniden şekillenmesinde gerçekleşen bir mekanizma olmadığı farklı dokularda yapılan çalışmalarda anlaşılmaktadır. Otofajik hücre ölümünün tükürük bezlerinde ve orta bağırsakta programlanmış hücre ölümü kontrolünde baskın rol aldığını tespit eden birçok çalışma mevcuttur. *Drosophila mellonella*'nın tükürük bezi ve orta bağırsağında, meydana gelen dejenerasyonda otofajik hücre ölümünün rol aldığı gösterilmiştir. *Drosophila melanogaster*'in tükürük bezlerindeki gibi büyük hücreler ve büyük dokuların fagositoz ile sindirilemeyecek kadar büyük olması nedeniyle, sitoplazmalarını kendi kendine otofajik hücre ölümüyle sindirmesi hem dokunun ortadan kaldırılmasına hizmet etmekte hem de hücre içeriklerinin diğer amaçlarla kullanılmasına olanak sağlamaktadır. *Galleria mellonella* ve *Bombyx mori* gibi lepidopterlerde larval orta bağırsağın dejenerasyonu da otofajinin apoptozis ile etkileşimi ile gerçekleşmektedir [89, 138, 146]. *Drosophila melanogaster* ve *Bombyx mori*'de oogenez süresince artan ekdizon sinyaline paralel olarak, görevini yitiren folikül hücrelerinin dejenerasyonunun neden olduğu otofajik hücre ölümü özellikleri tespit edilmiştir [147, 148]. *Bombyx mori*'de fonksiyonu sona eren ipek bezinin dejenerasyonunda yine

otofajik hücre ölümü markırları tespit edilmiştir [57]. Otofaji genlerinin *Caenorhabditis elegans*'ta stresle tetiklenen daurer larvaların oluşumu için gerekli olduğu tespit edilmiştir [149].

Hidrolitik bir enzim olan asit fosfataz (AF) lizozomal aktivitenin belirlenmesi için markır enzim olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Spesifik AF enzim aktivitesi kontrol ve 5 µg fenoksikarb uygulama grubu ekstra larval safhasında (8. instar) beslenmenin gerçekleştiği dönem boyunca oldukça yüksek seviyelerde bulunmuştur. Bu durum asit fosfataz enziminin lizozomik ve spesifik olmayan bir enzim olarak metabolik süreçte üstlenmiş olduğu görevlerden kaynaklanmaktadır. Beslenmenin aktif olduğu dönemde hücre metabolizması da son derece aktiftir. Yapım ve yıkım işlemlerinin yoğun gerçekleşmesi nedeniyle lizozomal aktiviteninde yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Larvanın beslenmeden kesildiği dönemden itibaren pupal evreye geçene dek AF aktivitesi düşüş göstermiştir. Pupal evre başlangıcında düşük enzim aktivitesine sahip olan hücrelerde pupal evrenin sonuna doğru AF aktivitesi yeniden artış göstermiş ve pupal evrenin son günü pik yapmıştır. Holometabol böceklerde pupal evrenin ilk günlerinde lizozomik aktivite ile larval safha süresince larva-pupal dönüşümde gereken enerji ve madde desteğini sağlamak için depolanan rezervlerin ihtiyaca göre kullanılacak maddelere dönüştürüldüğü bilinmektedir. Bu amaçla kullanılan temel mekanizma ise otofajidir [131]. Beslenmenin gerçekleşmediği bu dönemde katabolik reaksiyonları katalizleyen asit fosfataz enzim aktivitesindeki artışın depo materyallerin mobilizasyonu ile bağlantılı olduğu ileri sürülebilir.

Asit fosfataz enzim aktivitesinin çeşitli lepidopter dokularında metamorfik süreçte artış gösterdiği bilinmektedir [57, 89, 138, 150]. Yağ dokuda metamorfik süreçte artış gösterdiği ise farklı araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir [12, 138, 151, 152, 153]. Tian et al., [138] larval deri değişiminde ve metamorfozda *Bombyx mori* yağ dokusunda asit fosfataz enzim aktivitesinin artışının çalışmamızda olduğu gibi dokunun otofaji ile yeniden yapılanmasında üstlendiği rol ile ilişkilendirmiştir.

Daha öncede bahsettiğimiz gibi larval safhada yağ dokuda sentezlenerek hemolenfe salınan proteinlerin tekrar trofositler tarafından hücre içine alınması prepupal dönemde gerçekleşen 20HE piki ile tetiklenir. Prepupal dönemde yükselen JH ise hücrelerdeki protein sentezini baskılayıcı faktör olarak rol almaktadır [133].

Trofositler bu evrede dinlenme fazı olarak isimlendirilen döneme girmişlerdir [131]. Hormon salınımları da göz önünde bulunduğunda trofositlerin protein sentezi yapabilme yeteneklerindeki düşüşün proteolitik enzimlerin sentezlenmesini de olumsuz etkilemesi olası bir durum olarak kabul görebilir.

Sass et al., [150] iki farklı Lepidopter böcek türü olan *Mamestra brassicae* ve *Pieris brassicae* yağ dokusunda metamorfoz süresince asit fosfataz enzim aktivitesinin değişimini incelemişler ve çalışmamız ile benzer şekilde prepupal dönemde ve pupal deri değişiminde düşüş gösterdiğini, pupal deri değişiminden 2 gün sonra tekrar yükseldiğini ve pupal evrenin sonunda en yüksek seviyesine ulaştığını tespit etmişlerdir. Pupal safhada imajinal hücre farklılaşmasının başlamasına kadar depolanmış proteinleri sindirilmekten koruyan bir mekanizma olabileceğini ileri süren araştırmacılar *Calliphora erythrocephala* ve *Spodoptera litura* larvalarında da benzer aktivite değişim modelinin gözlemlendiğini belirtmişlerdir [150]. Prepupal dönemde asit fosfatazın yanı sıra β -glatosidaz ve catepsin-D lizozomik enzim aktivitelerini de inceleyen araştırmacılar, yağ dokuda bu üç enzim aktivitesindeki düşüşün bu hücrelerin protein sentezi yapabilme yetisindeki düşüşten kaynaklandığı yargısına varmışlardır. 20HE uygulamasının bile bu enzim aktivitelerini artırmaya etkisi olmadığını da belirtmişlerdir.

Tian et al., [138] *Bombyx mori* yağ dokusunda asit fosfataz enzim aktivitesindeki değişimleri 4. larval evrenin ortasından prepupal dönemin 2. gününe kadar belirlemiştir. Analizleri sonucunda genel olarak yağ dokuda tüm gelişim dönemlerinde hem ATG ekspresyon profillerini çıkarmışlar hem de asit fosfataz aktivitesini belirlemiştir. Larvanın beslenmeden kesildiği larval-larval deri değişimi ve prepupal dönemde otofajide artış gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Bu artışın 20HE salınımı ile aynı dönemlerde olduğunu vurgulayan araştırmacılar 20HE'un reseptörüyle oluşturduğu 20HE-EcR-USP kompleksinin yağ dokuda ATG genlerini uyararak otofagozom oluşumunu başlattığını bildirmişlerdir. Prepupal dönemde gerçekleşen bu artış bizim çalışmamızla çelişmektedir.

Çalışmamız ile benzer yönü ise kontrol ve uygulama grubunda tüm gelişim günlerinde spesifik asit fosfataz enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Fenoksikarb uygulama grubunda genel olarak asit fosfataz enzim aktivitesinin kontrol grubuna

kıyasla yüksek olduğuda görülmektedir. Özellikle beslenme döneminde metamorfoza hazırlanırken enzim aktivitesine ait sonuçlar ise yağ dokunun gelişimine bağlı olarak total protein miktarı değişimleriyle birlikte incelendiğinde, yoğun asit fosfataz aktivitesi olan günlerin yağ dokudaki metabolik faaliyetlerin yoğun olduğu günlerle uyumlu olduğu söylenilebilir. Bu durum yüksek asit fosfataz aktivitesinin yüksek protein miktarı ve metabolik reaksiyonların yoğunluğuyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Pupal safhanın ikinci yarısı artan asit fosfataz enzim aktivitesi azalan yağ doku total protein miktarı ile değerlendirildiğinde, enzim aktivitesindeki artışın protein yıkımı ile bağlantılı olduğu sonucu çıkmaktadır. Aynı gelişim döneminde yapılan elektron mikroskobu incelemelerinde sitosölde artış gösteren otolizozom yapıları asit fosfataz enzim aktivitesinin artışını destekleyici niteliktedir. Işık ve elektron immunohistokimyası lizozomal enzimlerin lipofuksin granülleriyle ilişkili olduğunu açığa çıkarmıştır [142]. Pupal dönemin sonuna doğru artan asit fosfataz enzim aktivitesi bulguları ile TEM görüntülerinde lipofuksin granülü olduğu belirlenen lizozomların artışı korelasyon göstermiştir. Bu açıdan mevcut çalışmalar ile uyumaktadır. Bir hücrede belirlenen çok sayıda otofagozom, o hücrenin PHÖ sürecini kabullendiğinin bir işareti olarak değerlendirilir [60]. *Calpodes ethlius*, *Bombyx mori*, *Ceratitis capitata* gibi Lepidopterlerde yapılan çalışmalarda asit fosfataz enziminin yağ dokuda programlanmış hücre ölümü ile gerçekleşen yeniden yapılanmada rol aldığını göstermektedir [92, 152, 153].

Larval deri değişiminde artış gösteren asit fosfataz enzim aktivitesi, otofajinin beslenmenin gerçekleşmediği deri değişimi süresince arttığını göstermektedir. Benzer şekilde *Bombyx mori* yağ dokusunda larval deri değişiminde ATG gen ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede artış gösterdiği dönemlerden birinin 20HE seviyesinin yüksek olduğu bilinen larval deri değişimi olduğu tespit edilmiştir [138]. Larval deri değişimleri süresince artan asit fosfataz enzim aktivitesi bu dönemdeki açlık koşuluna bir yanıt olarak ortaya çıkmış olabilir.

Yağ doku hücrelerinde son larval safhanın başlangıcında birkaç protein granülü olduğu düşünülen elektronca yoğun yapılar haricinde vakuol yapısına rastlanmamaktadır. Yaşayan, canlılık faaliyetlerinin devam ettiği hücrelerde bulunan

mitokondri ve endoplazmik retikulum yapıları ise larval safhanın başlarında fotoğraf üzerinde gösterilmiştir. Larval safhanın ilerlemesi ve özellikle gezinme ve örme davranışının gözlenmesiyle birlikte trofositlerde vakuolar yapının arttığı hem kontrol hem de fenoksikarb uygulama grubunda tespit edilmiştir. Fenoksikarb uygulama grubunda vakuolizasyonun daha fazla olduğu belirlenmiştir. Asit fosfataz aktivitesinde daha yüksek çıkması bu kanıyı desteklemiştir.

Sitosölde görülen zar katlanmaları, membranların geri dönüşümü ile ilişkilidir. Tirozin içeren vakuollerin paketlenerek hemolenfe salıverilmesinin ardından çok miktarda membranın yağ dokuda görüldüğü belirtilmektedir [131]. Sentezlenen depo materyallerinin hemolenfe salınması, hemolenften absorbe edilmesi membranların paketler oluşturmalarını gerektirmektedir. Kullanılan ve görevi sonlanan plazmik membranların geri dönüşümü nedeniyle zar katlanmaları sitosölde görülmektedir. Çalışmamızda özellikle gezinme ve örme davranışının gözleendiği dönemde bu yapılara rastlanmıştır. Hemolenfte artış gösteren ekdizona bir yanıt olarak hemolenfte depo edilen materyallerin yağ doku hücreleri tarafından absorbe edildiği düşünülecek olunursa membran geri dönüşümünün bir sonucu olan zar katlanmalarının sitosölde görülmesi beklenen bir durumdur.

Müller et al., [14], *Manduca sexta* yağ dokusunda sindirilmeyen kalıntıların TEM görüntülerinde koyu, elektronca yoğun ve homojen noktalar ya da lekeler olarak otofajik vakuoller içerisinde kaldığını belirtmektedir. Benzer şekilde *Bombyx mori* periferik ve periviserik yağ dokusunda sindirilemeyen kalıntıların elektronca yoğun materyal olarak pupal yağ dokuda kaldığı bildirilmiştir [12, 60]. Hatta Sumithra et al., [12, 60] bu elektronca yoğun yapıların apoptotik cisim benzeri görünüme sahip olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmamızda sindirilmeyen kalıntıların pupal safhanın sonunda heterojen görümlü elektronca yoğun yapılar olarak görüldüğü tespit edilmiştir. Özellikle pupal safhanın ilerleyen günlerinde artan vakuolizasyonun sekonder lizozomlar ve içerisinde birikim gösteren lipofuksin granülleri olduğu tespit edilmiştir. Lipofuksin granülleri elektronca yoğun vakuoller içerisinde daha açık yoğunlukta bölgelere sahiptir. Sindirilemedikleri için otolizozomlar içerisinde biriktikleri görülmüştür.

Wang and Haunerland, [13] çalışmalarında periviseral yağ dokusunda sentez işlemleri devam ederken, diğer bir yandan bazı organellerin yıkımının gerçekleştiği otofajik vakuollerin son larval safhada belirlemiş olup, safhanın sonuna doğru otofajik vakuollerin daha büyüdüğünü ve daha arttığını tespit etmişlerdir [13].

Pupal safhanın 6. günü elde edilen TEM görüntülerinde büyük lipid vakuolleri arasında sıkışmış nükleus ve yine vakuoller arasında ince hatlar halinde sitoplazmik bölgeler seçilmektedir. Sitoplazmik alanlarda hâkim olan yapı ise otolizozomlardır. Hücrelerde sitoplazmik alanların kısıtlanması ve bu bölgelerin yoğun olarak lipofuksin pigmentleri içeren lizozomlar bulundurması, aktif hücrenin belirteci olan mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerin zaten az yer kaplayan sitoplazmik bölgede bulunmayışı, hücrelerin yaşam faaliyetlerinin son aşamasında olduğunu düşündürmektedir.

4.2.6. Yeniden Şekillenme Sürecinde EcR-B1 ile Bağlantılı Olarak Ekdizonun Muhtemel Roller ve Fenoksikarb'ın Etkisi

Böcek steroid hormonu olan ekdizon hormonu böceğin gelişim sürecinde deri değişimini, hücrelerin çoğalmalarını, farklılaşmalarını ve programlanmış hücre ölümü yoluyla uzaklaştırılmalarını düzenler. Ekdizon hormonu heterodimerik EcR- USP kompleksi ile bağlanmasından sonra gen transkripsiyonunu düzenler. Bunu takip eden süreçte ise hiyerarşik transkripsiyonel düzenleme yoluyla biyolojik olayların yürütülmesine aracılık eder [154].

Fonksiyonel hormon-reseptör kompleksi böceklerde Broad, E74A, E74B, E75A, E75B gibi birçok ekdizonla bağlantılı genin transkripsiyonunu düzenler. Tüm bu düzenlemeler hücre çoğalması, farklılaşması ve programlanmış hücre ölümü gibi organizma genelindeki fizyolojik olayların düzenlenmesini içerir [6, 155, 156].

Larval evrede pupal değişimi kabullenme zamanında, tüm dokular yüksek seviyelerde EcR ekspresyonu gösterir [157]. Yapılan çalışmalarda ekdizon reseptörlerinin [65, 78, 82] ve USP proteinlerinin [79, 158] N-terminal A/B bölgelerinin farklılığından kaynaklanan izoformlara sahip olduğu tespit edilmiştir [159]. Birçok sistemde çeşitli reseptör izoformlarının profilleri farklı hormonal yanıt türleri ile korelasyon göstermekte olup bu durum özellikle EcR için belirgindir.

Larval- pupal metamorfoz sürecinde aynı 20HE sinyaline yanıt olarak, imajinal disk hücreleri ergin yapılara dönüşürken, larval dokular ya ölür ya da ergin dokulara yeniden yapılırlar. Genel olarak böceklerde tespit edilen ekdizon reseptörlerinden EcR-A'nın, ekdizon salınımına karşı ergine farklılaşma tepkisi verecek dokularda görüldüğü belirlenirken EcR-B1'in programlanmış hücre ölümü yoluyla uzaklaştırılacak hücrelerde baskın olarak eksprese olduğu tespit edilmiştir [82, 155, 154]. Bu durum larval dokularda metamorfozda gerçekleşen değişimlerde EcR-B1 ekspresyonunun önemini açıkça ortaya koymuştur. *Bombyx mori* anterior ipek bezi ve orta bağırsağında yapılan araştırmalarda dejenerasyon sırasında EcR-B1 ekspresyonunun gerçekleşmesi de bu kanıyı desteklemektedir [57, 59]. Bu bulgulara zıt olarak *Drosophila melanogaster*'nin merkezi sinir sisteminde yüksek seviyedeki EcR-A programlanmış hücre ölümü ile korelasyon gösterirken, EcR-B1'in ekspresyonu çoğalma ve yeniden yapılanma ile korelasyon göstermektedir [160]. Benzer şekilde *Tribolium castaneum*'da EcR-A ve EcR-B1 mutant larvalar ile yapılan detaylı moleküler çalışmalar yine larval safhada kritik rol üstlenen ekdizon reseptörünün EcR-A izoformu olduğunu ortaya koyarken genel kanıya alternatifler olabileceğini ileri sürmektedir [161]. Yapılan çalışmalar aynı ekdizon sinyali karşısındaki farklı dokuların farklı EcR izoformlarının ekspresyonunu gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır.

Heterodimer yapısına katılan farklı USP izoformlarının ekspresyonu da hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynamaktadır. *Manduca sexta*'da yapılan çalışmalarda USP izoformlarından USP-1'in iki deri değişimi arasındaki süreçte, USP-2'nin deri değişimlerinde baskın olarak eksprese olduğu tespit edilmiştir. Hormon salınımları da yine USP ekspresyonlarını etkilemektedir. USP-2 artışının doğrudan 20HE artışına bağlı olduğu tespit edilirken, JH varlığı ya da yokluğunun bu artışı etkilemediği belirtilmiştir. USP-1'deki azalışın ise yüksek 20HE konsantrasyonunda ancak JH varlığında meydana geldiği tespit edilmiştir. Ekdizon izoformlarının USP izoformlarıyla oluşturdukları heterodimer kombinasyonları, 20HE'nin transkripsiyon faktörü zincir reaksiyonunun farklılaşmasına neden olmaktadır [162].

JH'nun, deri değişimleri sırasında ekdizonun etkisini değiştirerek metamorfoz için gereken gen ekspresyonlarını durdurduğu ve metamorfozu engellediği bilinmektedir. JH ve analoglarının ekdizon aracılı transkripsiyon faktörlerini ve EcR

reseptör profillerini de etkilediği *Tribolium castaneum* [6] ve *Bombyx mori*'de [72, 59] gösterilmiştir.

Büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella*'da ipek bezinde yapılan çalışmada in vitro olarak 20HE ve JH-II uygulamaları sonrasında nükleer reseptör süper ailesi üyelerini kodlayan E75A-B, GHR3, EcR-A, EcR-B1 ve USP transkriptlerinin ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. Northern blotting analizi ile mRNA ekspresyonları incelenen *Galleria mellonella* ipek bezi örneklerinde EcR-A ve EcR-B1 transkriptleri için *Manduca sexta*'ya ait isoform-spesifik problr ile hibridizasyon gerçekleştirilmiştir [74]. Çalışmamızdaki western blotting yöntemi uygulamasında, bu uyumluluktan yola çıkılarak Iowa Üniversitesi, Developmental Studies Hybridoma Bank tarafından üretilen ve ticari olarak satışı olan ekdizon reseptör-B1 [EcR-B1-isoform-spesifik (6B7)] antibadisi kullanılmıştır. Söz konusu antibadi *Manduca sexta*'ya spesifik olup [78, 184] *Bombyx mori*'de de çalıştığı literatürde gösterilmiştir [59]. 6B7 antibadisi EcR-B1 izoformunun N-terminal bölgesinde 33 ile 110 aminoasitleri [83] arasında bulunan ve EcR-B1'e spesifik epitop bölgesine uyumlu monoklonal bir antibadidir. Denemelerimiz sonucunda *Galleria mellonella* yağ dokusunda çalışan antibadi *Manduca sexta* ile *Galleria mellonella* EcR-B1 proteininin epitop bölgelerinin benzer olduğunu göstermiştir.

Tahmini olarak 64 kDa moleküler ağırlığına sahip 6B7 antibadisi *Galleria mellonella* periviserel yağ dokusunda ~62 kDa olarak bulunmuştur. Kontrol olarak yüklenen *Bombyx mori* pupal yağ dokusuna ait örnekte ~64 kDa olarak tespit edilmiştir. Larval safhada 3 bant, pupal safhada ise 2 bant olarak görülmektedir. Proteinler bazen SDS-PAGE jelde beklenilenden farklı göç edebilmektedir. Eğer immunoblotting ile tespit etmek istenilen protein tam anlamıyla globuler değilse ya da post-translasyonel modifikasyonlar ile proteinin moleküler ağırlığı değişmiş ise göç etme hızı değişebilmektedir. Bu durumda söz konusu protein membranda beklenen bölgeden farklı yerde tespit edilebilir. Bir proteinin membranda çoklu bantlar halinde görülmesinin temel nedenleri arasında proteinin izoformlarının olması ihtimali yatmaktadır. Bu nedenle protein database sisteminden proteinin izoformunun olup olmadığı, polimorfizm gösterip göstermediği araştırılması gerekmektedir. Ancak bu durum sadece aminoasit (aa) dizisi bilinen ve database'de yer alan proteinler için mümkün olabilmektedir. *Galleria mellonella* EcR-B1 aa dizisi ya da protein yapısı

hakkında detaylı bilgi ise henüz mevcut değildir. Bunun dışında tespit edilmek istenen proteinin proteolitik kırılmaya maruz kaldığı düşünülebilir. Optimizasyondan kaynaklı bir hatanın olup olmadığı pozitif kontrol olarak yüklenen *Bombyx mori*'ye ait örnek ile takip edilmiştir. Kontrol örneğinin de aynı protokol basamaklarına maruz kaldığı düşünülecek olursa proteaz inhibitörü ya da indirgeyici ajan yetersizliği, fazla primer veya sekonder antibadi konsantrasyonu, bloklama solüsyonu basamağında süre veya kullanılan protein miktarının artırılması gibi nedenlerden kaynaklı bir hata değil de proteinin yapısal farklılığından kaynaklı bir durumun söz konusu olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda *Galleria mellonella*'da larval-pupal metamorfozun altında yatan moleküler mekanizmaları tanımlamak için, fenoksikarb ile muamele edilmiş larvalarda EcR-B1 reseptör proteini ekstra larval deri değiştiren larvalar ve normal olarak metamorfoz geçirerek pupalaşan larvalardaki proteinlerle karşılaştırılmıştır. EcR izoformlarının protein seviyelerinin mRNA ekspresyon seviyelerini yansıttığı bilinmektedir [162]. Western blotting yöntemiyle periviseral yağ dokusunda EcR-B1 proteini ekspresyonu belirlenerek böcekler ile yapılan mevcut çalışmalar ışığında değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu larvalarında ekdizon reseptörünün ortaya çıkışı larvanın kritik ağırlığa ulaştıktan sonra beslenmeden kesilmesinin ardından (S2) gerçekleşmiştir. Larvanın beslenmeden kesilmesinde küçük ekdizon pikinin rol aldığı düşünülecek olunursa S2'de EcR-B1 ekspresyonunun yağ dokuda zayıfta olsa varlığı açıklanabilir. Larval-pupal metamorfoz süresince EcR-B1 bandının nispi yoğunluğu sürekli artış göstermiş olup hareketsiz prepupal dönemde (S5) kaydedilen en yüksek değerlere ulaşmıştır. Elde edilen sonuçlar bu dönemde hormon salınımlarıyla bağlantılı olarak incelendiğinde 20HE'nin EcR-B1 üzerinde protein ekspresyonunu artırıcı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Holometabol böceklerde görülen bağırsak boşalmasının metamorfik döngüde büyük ekdizon pikinin gerçekleşmiş olduğunu gösteren bir indikatör olarak değerlendirildiğini daha önce de vurgulamıştık. Gezinme davranışının gözlemlendiği dönemde gerçekleşen 20HE artışı EcR-B1'in ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim sergilemiştir. Tiroid hormonlarında olduğu gibi reseptör izoformlarının ekspresyonu kendi ligandları tarafından düzenlenebilmektedir [160]. Hemolenfte bulunan 20HE miktarının EcR-B1 ekspresyonunu artırdığına ilişkin

çeşitli böceklerde ve farklı dokularda yapılmış çalışmalar mevcuttur [155, 160, 162]. *Galleria mellonella* ipek bezinde de 20HE'nin EcR-B1 ekspresyonunu artırıcı etkisi gösterilmiştir [74]. Çalışmamızda hemolenfteki seviyesi arttığı bilinen 20HE'nin, yağ doku EcR-B1 ekspresyonunu pozitif yönde etkilediği belirlenmiştir.

Galleria mellonella hemolenfinde 20HE seviyesi koza örmeyi tamamlayan larvalarda pupal deri değişiminden hemen önce en yüksek piki gerçekleştirir ve ardından hızlıca düşer [18]. EcR-B1 seviyesi ise en yüksek seviyesine pupal deri değişiminden önce hareketsiz prepupal dönemde (S5) ulaşır, pupal deri değişiminin ardından bir miktar düşüş gösterir. Hemolenfte artan ligand, reseptör ekspresyonunun artışını teşvik etmektedir.

20HE uygulaması, EcR mRNA seviyesini *Manduca sexta* epidermis hücrelerinde in vitro olarak doğrudan uyarmaktadır [84]. Kamimura et al., [84] *Bombyx mori*'de gezinme davranışı döneminde EcR mRNA'larının yağ dokuda ve kanat disklerinde bol olduğunu rapor etmiştir. *Galleria mellonella* periviseral yağ dokusunun yeniden şekillenme sürecinde EcR-B1 ekspresyonu western blotting ile tespit edilmiş olup elde edilen sonuçlar literatürdeki bulgular ile uyumluluk göstermektedir. EcR-B1 ekspresyonu *Bombyx mori*'de yapılan çalışmada yağ dokuda gezinme davranışının ertesi günü baskın olarak bulunmuştur [155]. Ekspresyonunun zamanlamasına bakıldığında EcR-B1 reseptör proteininin yeniden şekillenme sürecinde larval yağ doku hücrelerinin yapılanmasında rol oynadığı anlaşılmaktadır.

Pupal safhada EcR-B1 proteini tüm günlerde belirlenmiştir. Reseptörün nispi yoğunluğuna ait veriler incelendiğinde hareketsiz prepupal dönemde (S5) EcR-B1'in pupal deri değişiminin ardından (P0) tespit edilenin yaklaşık 2,5 katı olduğu görülmektedir. Hemolenfteki 20HE seviyesi pupal safhada larvadan çok daha yüksek seviyelere ulaşmaktadır [18]. Pupal deri değişiminden önce gerçekleşen 20HE pik değeri 3400 nM olarak, pupal deri değişiminin ardından dişilerde 7700 nM, erkeklerde 8800 nM olarak tespit edilmiştir. Ligand miktarı arttığı halde reseptör ekspresyonu düşüş göstermiştir. Riddiford et al., [162] son larval evrede *Manduca sexta* epidermisinde kültür ortamında yaptıkları çalışmada EcR-B1 mRNA seviyesinin yüksek doz ekdisteroid uygulamasının ardından düşüşe geçtiğini bildirmişlerdir. Bu

çalışma pupada yüksek miktarlarda 20HE seviyelerine rağmen EcR-B1 proteini nispi yoğunluğunun yağ dokudaki azalışını açıklamaktadır.

Pupal evrenin ilk yarısı 20HE hemolenfte hem dişide hem de erkekte sırasıyla 2-3 pik seviyesi sergiler. Erkeklerde kaydedilen değerler dişilerden daha yüksektir. Pupal evrenin ikinci yarısı ise erkeklerde bazal seviyeye inen 20HE, dişi pupalarda ovaryum tarafından meydana getirilen dişiye spesifik bir pik gerçekleştirir. Yine de pupal evrede tespit edilen 20HE değerleri larval evrede tespit edilenden daha yüksektir [18]. Pupal evre EcR-B1 proteini nispi yoğunluğunda karşılaşılan iniş-çıkışların olası nedeninin hem dişi hem de erkek pupaların yağ dokusunun bir arada analiz edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Son larval evrenin 0. günü yapılan fenoksikarb uygulamasının ardından ekstra larval evreye geçene kadar olan döneme ait periviseral yağ doku örneklerinde EcR-B1 proteini belirlenememiştir. Yüksek 20HE salınımı ile birlikte hemolenfte JH'nın da yüksek seviyelere ulaşması larvalarda larval-larval deri değişimini uyarmıştır. *Manduca sexta* epidermisinde yapılan çalışmada yüksek miktardaki JH'nın EcR izoformlarının miktarındaki artışı inhibe edebildiği kültür ortamında gösterilmiştir [163]. Sonuçlarımız bu çalışmanın verileri ile değerlendirildiğinde larval-larval deri değişiminde hemolenfte yüksek miktarda bulunan JH'nun, EcR-B1 proteini ekspresyonunu inhibe etmiş olabileceğini göstermektedir.

Ekdizon, kendi reseptörlerinin ekspresyonunu uyarmaktadır [162]. Kamimura et al., [155], yaptıkları çalışmada son larval-larval deri değişiminden önce anterior ipek bezinde EcR-B1'ibelirlemiş, ekspresyon seviyesinin hemolenfteki 20HE seviyesi ile senkronize değişim gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı evrede belirlenen EcR-A ekspresyonu paterni ise daha düşük 20HE konsantrasyonu ile eksprese olabildiğini, son larval evrede hemolenfte yüksek konsantrasyonda 20HE bulunduğunda ise anterior ipek bezinde reseptör ekspresyonunun azaldığını göstermiştir [155]. Reseptör izoformları aynı böcek türünde safhaya spesifik ekspresyon karakteri sergilediği gibi safha içerisinde birbirinden bağımsız iniş çıkış özellikleri de sergilemektedir. 20HE'nin pik yaptığı bilinen larval-pupal deri değişiminde ekspresyonunun artması ancak yine 20HE piki gerçekleşen larval-larval deri değişiminde belirlenmemesi EcR-

B1'in safhaya spesifik ekspresyon profiline sahip olduğunu ve ekspresyonun juvenil hormon tarafından inhibe edildiğini gösterebilir.

Tribolium castaneum ile yapılan bir çalışmaya göre, JH analogu hidropren uygulamasının ardından benzer şekilde larval- larval deri değişimi sonrası ekstra larval deri değişimi gerçekleşmiştir. Bu ekstra larval-larval deri değişiminde hem EcR-A hem de EcR-B ekspresyonu tespit edilmiştir. EcR-A izoformu ekspresyon seviyesinin de EcR-B'den daha düşük seviyelerde olduğu ancak süreçte önemsenecek düzeyde arttığı rapor edilmiştir [6]. *Manduca sexta* epidermisinde son larval evrede yapılan bir çalışmada ise EcR-B1 ve EcR-A izoformlarının her ikisinin de larval ya da pupal olmasına bakılmaksızın deri değişimi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir [162]. Çalışmamızda ekstra larval deri değişimi geçiren larvalarda EcR-B1 proteinini ekspresyonuna rastlanmamıştır. Bu durumun nedeni *Galleria mellonella*'da larval-larval deri değişiminde yağ dokuda baskın olarak eksprese olan EcR izoformunun EcR-A olabileceğini düşündürmektedir.

Ekstra larval deri değiştirerek 8. instara geçen larvalara ait periviseral yağ doku örneklerinde, EcR-B1, tüm günlerde çok düşük seviyelerde belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı ekdizon reseptörü ekspresyonu artışı, larvada bağırsak boşalmasına neden olduğu bilinen ekdizon pikinin gerçekleştiği gelişim döneminde (8-S3) görülmüştür. Ardından kontrol grubunda olduğu gibi pupal deri değişimine kadar artmıştır. *Galleria mellonella*'da 0. günde fenoksikarb uygulamasının ardından hemolenfte görülen 20HE ve JH miktarlarına ilişkin yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bu gruptaki hayvanlarda beslenmeden kesilerek gezinme ve örme davranışının gözlenmesi ve bağırsak boşalmasının ardından pupal deri değişimlerinin gerçekleşmesi 20HE artışlarının meydana geldiği dönemlerin birer göstergesi olarak değerlendirilebilir. Bunun yanı sıra Kadono et al., [164] metopren uygulaması ile ekstra larval evreye geçen *Bombyx mori* larvalarının ekdisteroid seviyelerini radioimmunoassay yöntemiyle belirlemiştir. Uygulama yapılan grupta örme davranışının 20HE ile eş zamanlı gerçekleştiğini göztermiştir.

EcR-B1 protein ekspresyonunun ekdizona bağlı olduğu göz önüne alınacak olunursa tüm günlerde EcR-B1 görülmesi beklenenin dışında çelişkili bir durum gibi görülmektedir. *Bombyx mori* türü kanat disk gelişiminde EcR-B1 mRNA ekspresyon

düzeyinin tespitine ilişkin yapılan çalışmada çok küçük miktarlarda ekdisteoid miktarının EcR mRNA transkripsiyonunu başlatabileceği rapor edilmiştir [84]. 8. larval evrede 20HE miktarlarının belirlenmesi EcR-B1'in pupal evre boyunca ekspresyon profilinin yorumlanması için önemlidir. Bir sonuç *Bombyx mori*'de anterior ipek bezinde de vurgulanmıştır. Çalışmada son larval evre süresince northern blotting ile EcR-B1'in mRNA ekspresyonu incelenmiş ve beslenme periyodu da dahil olmak üzere her gün ekspresyonunun gerçekleştiği tespit edilmiştir. Hemolenfte 20HE seviyesindeki artış ile mRNA seviyesi de artmıştır. Sonuç olarak düşük konsantrasyonlardaki ekdisteoidlerin reseptörlerin ekspresyonunu uyardığı rapor edilmiştir [155]. Göncü and Parlak [59] gerçekleştirdiği bir çalışmada kontrol ve fenoksikarb uygulamasının ardından orta bağırsakta EcR-B1 proteinini western blotting ile belirlemiştir. Hormon uygulanan deney grubunda larvalar beslenme periyodundayken dahi zayıf EcR-B1 ekspresyonu tespit edilirken, proteinin ekspresyon seviyesi beslenmenin kesilmesinden sonra larvalar örme davranışı gösterirken pik seviyesine ulaşmıştır.

Ekstra larval safha sonunda hareketsiz prepupal dönemde (8-S5) tespit edilen EcR-B1 nispi yoğunluğu 1,2 birim bulunmuştur. Bu değer kontrol grubunda S5'de bulunan değer iki katıdır. Pupal deri değişimi ile EcR-B1 nisbi yoğunluğu düşmüştür. Elde edilen nispi yoğunluk değerleri ise kontrol grubunda aynı günlerde belirlenen EcR-B1 proteininin nispi yoğunluk değerlerinin yaklaşık iki katı kadardır. EcR-B1 proteinleri ligandları olmadığında hücrenin nükleusunda bulunmaktadır [85, 165]. *Manduca sexta* epidermisinde yapılan çalışmada EcR-B1 proteini hücrenin sitoplazmasında bulunduğu yarılanma ömrünün JH etkisiyle uzadığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra aynı çalışmada proteinin yarılanma ömrünün mRNA'sından uzun olduğu ve JH'nun bir şekilde reseptör proteininin stabilizasyon süresini uzattığı belirtilmiştir. Tüm bu veriler bir arada değerlendirildiğinde, fenoksikarb uygulamasının EcR-B1 proteinin hücrelerde bulunma süresini uzatabileceğinden pupal dönem süresince devamlı ve kontrol grubundan yaklaşık iki kat yüksek seviyelerde bulunması açıklanabilir.

Pupal evrenin tüm günlerinde hem kontrol hem de fenoksikarb uygulama grubu pupalarında tespit edilen EcR-B1 reseptör proteininin otofajik hücre ölümü ile ilişki

olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde *Bombyx mori* anterior ipek bezinde EcR-B1 proteininin belirlenmesinin hemen ardından otofajinin başladığı tespit edilmiştir [57].

Böceklerde iki temel faktörün otofajiyi başlattığı bilinmektedir. Bunlar açlık ve 20HE sinyalleridir [41]. Belirli koşullar altında, otofaji, hücreyi apoptozdan korumakla birlikte geniş çapta gerçekleşen bir otofaji hücreyi ölüme götürmektedir [44]. Otofaji hücrenin canlılığını sürdürmek için özellikle besin kıtlığı gibi zor koşullarda kullandığı stratejik bir yol olarak hizmet gördüğü halde programlanmış hücre ölümü tiplerinden II.'si olarak fonksiyonunu yitiren hücrelerin ortadan kaldırılmasına da hizmet eden karmaşık bir mekanizmadır. *Drosophila melanogaster*'de otofaji larval safhanın sonunda gözlemlenmiştir. Yağ dokuda ekdizon sinyali ile sınıf-I PI3K yolağının inhibe edilmesi sonucu otofajinin tetiklendiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada metamorfik süreçlerde hormonal etkiler, prepupal ve pupal dönem gibi beslenmenin gerçekleşmediği koşullar altında programlı otofaji süreçlerinin gerçekleştiği açıkça ortaya koyulmaktadır.

20HE-EcR-USP kompleksinin TORC1 aktivitesini inhibe ederek otofajiyi başlattığı *Drosophila* yağ dokusunda gösterilmiştir. TORC1, otofaji mekanizmasını bloke eden temel bir kompleks moleküldür. Çok sayıda upstream sinyalinden gelen bilgileri birleştirerek otofajiyi inhibe eder [138, 139].

Steroidler, hayvanlarda programlanmış hücre ölümünün önemli düzenleyicileri olarak bilinmektedir. *Drosophila* gelişimi süresince, steroid 20HE'nin larval tükürük bezleri de dahil olmak üzere birçok larval dokunun hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Pupal deri değişiminden 12 saat sonra 20HE'nin yükselişi tükürük bezinde otofajik hücre ölümünü başlatır ve bu doku pupal deri değişiminden 16 saat sonra tamamen tahrip olur. Tian et al., [138] *Bombyx mori* yağ dokusunda gerçekleştirdikleri araştırmada otofaji ve ATG genlerinin ekspresyonlarının 20HE ile uyarılabildiğini tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra *Drosophila melanogaster* yağ dokusunda EcR ekspresyonunun 20HE'nun başlattığı otofaji mekanizması için gerekli olduğu belirtilmiştir [139].

Çalışmamızda eksprese olduğu tespit edilen EcR-B1 reseptör proteininin asit fosfataz enzim aktivitesi ve otolizozom artışıyla korelasyon göstermesi, otofajide 20HE'nun EcR-B1 reseptörü aracılığıyla etkili olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda prepupal dönemde artış gösteren 20HE piki ile kontrol ve fenoksikarb uygulama grubunda görülen otofajik vakuoller ile birlikte özellikle pupal evrede gün gün artan asit fosfataz enzim aktivitesi bulguları *Galleria periviseral* yağ dokusunda yeniden şekillenme sürecinde otofajinin oynadığı rolü açıkça ortaya koymaktadır. Tüm bu bulguların yanı sıra pupal safhada belirlenen kaspaz 3 enzim aktivitesi otofajinin yanında apoptozise spesifik kaspaz 3 enziminin aktivasyonun da sürece dahil olduğu belirlenmiştir. Kaspaz 3 enzim aktivitesinin belirlenmesi ancak DNA fragmentasyonuna ilişkin bulguya rastlanmaması kaspaz 3'ün hücreyi apoptoza yönlendirmenin dışında yeniden şekillenme sürecinde farklı bir rol üstlendiğini düşündürmektedir.

Kaspazların hücrel fonksiyonları birden çok yolla düzenlediği yapılan çalışmalar ile açığa çıkmıştır. Programlanmış hücre ölümünde aktivasyonları ve mekanizmaları nispeten iyi tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalar, kaspazların apoptoz dışında farklı fonksiyonları üstlenmiş olduğunu da göstermektedir. Çeşitli kaspazların doku farklılaşması, hücre çoğalması, tümör oluşumu ve metastaz, immün yanıt oluşturma, DNA hasarı ve stres yanıtı olma, metabolizma ve yaşlanma ile ilişkili olduğu yapılmış çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [166].

Drosophila melanogaster'de kaspaz 8'in ortoloğu olarak tanımlanan Dredd geninin, yapılan araştırmada doğal bağışıklık yanıtının bir düzenleyicisi olduğu saptanmıştır. Çalışmada Dredd mutantlarının, gram-negatif bakterilere karşı yüksek duyarlılığa sahip olduğu, drosomisin gibi antibakteriyel peptidlerin ise hatalı üretildiği sonuçları elde edilmiştir. Bu çalışma ile kaspazların *Drosophila melanogaster*'in immün sisteminin düzenlenmesinde önemli bir rol aldıkları gösterilmiştir [166]. Yürütücü kaspazların doku rejenerasyonunda rol aldığı ilk olarak yine bir omurgasız olan *Drosophila melanogaster* imajinal dokularında tanımlanmıştır. Kaspazların apoptotik fonksiyonlarının yanı sıra hücre boyutu ve hasar karşısında gerçekleşen hücre kayıplarında telafi edici fonksiyonuna ilişkin *in vivo* deneyler gerçekleştirilmiştir [166].

Memelilerde "inflamatuvar kaspazlar" olarak adlandırılan ve insan kaspaz 1, 4, 5, 12 ve fare kaspaz 1, 11 ve 12'yi içeren doğal bağışıklık yanıtının önemli araçları olarak tanımlanan kaspazlar vardır. Kaspaz-1, inflamatuvar kaspaz ailesinin prototipik üyesi iken; kaspaz 4 ve 5'in fonksiyonları iyi tanımlanmamıştır [167, 168].

Drosophila melanogaster kaspazların farklılaşma üzerindeki rollerinin anlaşılması için en uygun model hayvan olarak kabul görmektedir. Böcek metamorfozunda, larval nöronlar yetişkin sinir sistemini oluşturmak için bir tür değişim geçiriler. Larval dendritler ve aksonlar gibi sitoplazmik nöron bölgeleri kaldırılır ancak nöronda programlanmış hücre ölümü gerçekleşmez. Ergin için yeniden yapılırlar. Bu süreçte dendritlerin ortadan kaldırılması, iskeletlerinin parçalanması ve hücresel fragmanların fagositik hücreler tarafından temizlenmesi dendritlerde aktif kaspaz lokalizasyonu yönünden apoptosise benzese de, nöronda hücre ölümünün gerçekleşmesi olmaksızın sadece hücrelerin bölümlerinde apoptotik değişikliklere neden olduğunu göstermektedir [168].

Kaspazlar arasında özellikle kaspaz 3, doku farklılaşmasında, rejenerasyonda ve nöral gelişimde, farklı ve herhangi bir apoptotik aktivite içermeyen şekillerde önemli rollere sahiptir. Memelilerde keratinositler, megakaryositler, eritrositler ve lens hücrelerinin dâhil olduğu çeşitli hücre tiplerinde terminal farklılaşmalarında kaspazların aktif fonksiyonu olduğu belirlenmiştir. Yürütücü kaspazlardan kaspaz 3'ün lens fiberlerinin oluşumunda apoptotik olmayan fonksiyonu tespit edilmiştir. Embriyonik keratinositlerin terminal farklılaşmasının yanı sıra kas progenitor hücrelerinin farklılaşması, miyotüplerin ve miyofibrillerin oluşumu yine kaspaz 3'e bağımlı gerçekleşmektedir [166, 168]. Yine *Drosophila melanogaster*'de sperm farklılaşması süresince her bir kistte bulunan 64 haploid spermatid sitoplazmik köprüler ile birbirine bağlantı halindeyken, bu köprülerin ortadan kaldırılması sonucu spermler tek hücreler haline geçerek farklılaşır, bu sırada sitoplazmalarının çoğunu da kaybederler. Spermatogenezin bu sürecinde sperm kuyruğuna doğru ilerleyen lokalizasyonda aktif kaspaz 3 immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir [168]. Kaspaz 3'ün embriyonik ve hematopoietik kök hücrelerin farklılaşmasında aktif rol aldığı da bilinmektedir [168, 169, 170].

Yağ dokunun yeniden yapılanma sürecinde ergin yağ dokusunu oluşturacak hücrelerin kök hücrelerden farklılaşarak geliştiği bilinmektedir [7]. Pupal dönemde, hemosölde bir yandan programlanmış hücre ölümü ile yıkım süreci yaşayan larval yağ doku hücreleri bulunurken, bir yandan da ergin yağ doku hücreleri gelişmektedir. Tespit edilen kaspaz 3 enzim aktivitesi, hemosölden alınan her iki tip hücreyi de içermektedir. Kaspaz 3 enziminin farklılaşma üzerinde aldığı aktif rollere ilişkin literatür bilgisi ve elde edilen kaspaz 3 enzim aktivitesi grafiği, mevcut enzim aktivitesinin farklılaşmakta olan kök hücrelerinde katkısı olabileceği fikrini oluşturmuştur.

Kaspaz 3'ün dahil olduğu birçok kaspazın rolünün apoptoz ile sınırlı olmadığı yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Otofajik vakuollerin ve spesifik asit fosfataz enzim aktivitesinin yanında spesifik kaspaz-3 enzim aktivitesinin de bulunmasını ancak DNA fragmentasyonunun olmamasını açıklar niteliktedir. TUNEL yöntemiyle DNA fragmentasyonunun dikkate değer seviyede gösterilememesi kaspazların DNA fragmentasyonunun yanı sıra farklı bir yıkım sürecine de aracılık ediyor olabileceğini düşündürmektedir.

Farklı çalışmalar otofaji ve apoptozun, birbirleri ile iç içe geçmiş iki farklı tip programlanmış hücre ölümü olduğunu göstermiştir [58]. Son yapılan araştırmalar ise birçok ATG proteininin kaspaz substratı olduğunu ve kaspazlar tarafından yıkıma uğratıldığını göstermektedir [51]. Örneğin insan ATG 3 proteininin kaspaz 3, 6 ve 7'nin substratıdır. İnsan beclin-1 proteini olarak bilinen ATG 6 proteini kaspaz 3 substratı olup, kırılmış Beclin-1'in otofajiyi inhibe ettiği ve HeLa hücrelerinde apoptozisi teşvik ettiği bulunmuştur. Yine ATG 4'ün kaspaz substratı olan bir diğer molekül olduğu tespit edilmiştir. Kaspaz 2'nin otofajiyi baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Diğer çalışmalar, insan ATG 3'ün kaspaz 8'in doğrudan bir hedefi olduğunu ve kırılan ATG 3'ün otofajiyi inhibe ettiği gösterilmiştir. *Drosophila melanogaster* yürütücü kaspazların açlık kaynaklı stresi takiben mitokondriye lokalize olduğu ve otofajiyi pozitif olarak düzenlediği bulunmuştur [167]. Hem kaspaz 3 hem de kaspaz 7 mutanları farelerde karaciğer rejenerasyonunun ve yara iyileşmesinin aksadığı tespit edilmiştir [171]. Hatta bazı durumlarda kaspazların, hücreyi hücrel intihar sisteminden korumak amacıyla ATG'leri sindirerek moleküler birer fren gibi davranabildikleri bildirilmiştir [52]. Oysaki lepidopterlerden *Manduca sexta* *Bombyx mori*'de DNA

fragmentasyonu hem elektroforetik olarak hem de TUNEL metoduyla gösterilmiştir [11, 12, 14, 60]. Diptерlerden *Drosophila melanogaster*'de ise yağ dokuda etkili mekanizmanın otofaji olduğu bildirilmiştir [63]. Eğer kaspazların dokuyu apoptotik hücre ölümüne yönlendirmiyorsa fonksiyonunun ne olduğuna ilişkin detaylı araştırmalar yapılmalıdır.

Hücreyi koruyucu rolüne rağmen, otofaji belirli bir eşik değerinin üzerinde engellenmeden ilerlerse, hücre ölüm markırlarının ekspresyonlarının uyarılmasına ve apoptotik yolağın aktivasyonuna yol açabilir [51]. Pupal safhada gerçekleşen otofaji hücrelerde lipofuksin pigmentleri kalana dek devamlılık göstermiştir. Brunk and Terman [142], lipofuksine bağlı demir molekülünün, lizozomları oksidatif strese duyarlı hale getirdiği, lizozomal dayanıklılığı tehlikeye attığı ve lizozomal içeriğın salınmasına bağlı olarak apoptozise neden olduğunu bildirmiştir. Daha öncede bahsedildiği gibi *Drosophila melanogaster*'de larval yağ doku hücrelerinin pupal dönemi otofajıyla geçirdiğini ve erginde ilk 2-3 gün içinde kaspaz kaskadına maruz kalarak programlanmış hücre ölümüyle ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir [63]. Benzer bir durumun *Galleria mellonella*'da da görülüyor olması muhtemeldir. Pupal yaşamın devam edebilmesini; ergin için gereken doku ve organların gelişiminin sağlanabilmesi için kaynak olarak trofositlerdeki rezervlerin kullanımına olanak sağlayan mekanizmanın otofaji olduğu anlaşılmaktadır. Otofaji burada canlının hayatta kalmasına ancak yağ doku hücrelerinin ölmesine hizmet eden bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Otofajik hücre ölümü ile yağ doku hücrelerinin kendini tüketerek pupal dönem gibi uzun bir süreçte ve yavaş yavaş öldüğü tespit edilmiştir. Artan otolizozomlar, hücre yaşlılığının sembolü olan ve insanlarda dahi yaşlandıkça el, yüz ve omuzlarda oluşan kahverengi lekelenmelerin nedeni birikimi artan lipofuksin pigmentleri, daralan sitoplazmik alanlarda lizozom dışında organellerin tespit edilemeyişi, düşük protein içeriğine karşın yüksek asit fosfataz enzim aktivitesi sürecin geri dönüşümü olmaksızın ilerlediğinin kanıtı gösterilebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, büyük balmumu güvesi *Galleria mellonealla*'nın bir JH analogu olan fenoksikarba olan tepkisi ve fenoksikarbın farklı dozlarının larval evrede oluşturduğu etkiler incelenmiştir. Son larval evrede *Galleria mellonella* larvalarında topikal fenoksikarb uygulaması doza bağlı olarak; normal gelişim ve pupalaşma, kararak ölme, zayıf gelişim ve pupalaşamama, ekstra larval deri değişimi ve pupalaşma gibi dört farklı durumun görülmesine neden olmuştur. 750 ng ve üzeri tüm doz uygulamalarında larvalarda ekstra larval safha yaşanmış olup, safha sonunda larvalar sağlıklı pupalar oluşturmuşlardır. Ancak, erginlerin bıraktığı yumurtalardan larva çıkışı gözlenmiştir.

Çalışma dozu olarak seçilen ve 7. larval evrenin 0. günü uygulanan 5 µg fenoksikarb uygulaması normal larval-pupal metamorfozu engelleyerek, ekstra larval deri değişimine neden olmuştur. Ekstra larval evre, normal son larval evreden daha uzun sürmüştür. Süredeki uzama beslenme periyodunun uzamasından kaynaklanmıştır.

0. gün gerçekleştirilen 5 µg fenoksikarb uygulamasının ardından 7. larval evrede larval yağ doku hücrelerinde programlanmış hücre ölümü ile yağ dokunun yeniden şekillenme sürecinin engellenmiştir. Uygulamanın bir sonucu olarak ekstra larval deri değişimi görülmüştür.

Kontrol grubu larvaları yaklaşık 3,5 gün beslenmiştir. Yaklaşık 2 gün süresince gezinme ve örme davranışı gösterdikleri belirlenen larvalarda bağırsak boşalmasını takiben pupal deri değişimi gözlenmiştir. Pupal deri değişimine kadar geçen bu süre 6 ile 7 gün arasında sürmüştür. Ekstra larval deri değişimi geçiren larvalarda ise 11 gün süresince bağırsak boşalması gerçekleşmediği ve beslenme süresinin uzadığı gözlenmiştir. 11. günün sonunda metamorfoz için gereken ekdizon salınımının gerçekleştiği, bağırsak boşalması ile anlaşılmıştır. 7 ile 11. günler arasında larvalarda beslenmenin baskılandığı, ağırlık ortalamalarında istatistiksel olarak değişim olmaması ile de belirlenmiştir. Bağırsak boşalmasının ardından, pupal deri değişimi ve pupal safha sürelerinin kontrol grubuyla aynı sürede tamamlanması S3 ve 8-S3'ten

itibaren hormonal şartların kontrol grubunda ortaya çıkan hormonal şartlarla aynı olduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilir.

20HE'nin yağ dokunun yeniden şekillenme süreçlerini transkripsiyonel seviyede başlatan esas molekül olduğu bilinmektedir. *Galleria mellonella*'da da bu görevi EcR-B1 vasıtasıyla gerçekleştirdiği sonucuna ulaşılmıştır. JH'un ise metamorfozu ve yağ dokunun yeniden şekillenmesini engelleyerek ekstra larval deri değişimini uyardığı tespit edilmiştir.

Yağ dokunun böcek yaşamındaki önemini ve fonksiyonlarını göz önüne aldığımızda, otofajinin hücre bileşenlerini geri dönüşüme uğratarak yeniden şekillenme süreçlerinde farklı doku ve organlarca da kullanılabilen moleküllere dönüştürme görevini gerçekleştirdiğini anlamaktayız. Larval-pupal dönüşüm sırasında otofajik vakuollerin ve asit fosfataz enzim aktivitesinin tespit edilmesi otofajinin gerçekleşmekte olduğunu göstermektedir. Ancak, asit fosfataz enzim aktivitesi değişimlerinin pupal safha başlarında düşükken safha sonuna kadar sürekli artmıştır. Bu artış total protein miktarının düşüşü ile bir değerlendirildiğinde ve elektron mikroskobu görüntülerinde sitosölde otofajik vakuollerin hızlıca artışı, yağ dokunun yeniden şekillenme süreçlerini yönlendiren esas mekanizmanın baskın olarak otofajik hücre ölümü olduğunu göstermektedir. DNA fragmentasyonu, apoptotik cisim ve fagositik hücrelerin bulunmaması gibi apoptotik hücre ölümü markırlarının görülmemesi ancak, yüksek kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmemesi; apoptotik hücre ölümünün süreçte etkin bir mekanizma olmadığını doğrulamaktadır. DNA fragmentasyonuna neden olduğu bilinen kaspaz-3 enzim aktivitesinin ise otofaji ile ilişkili farklı bir göreve hizmet ettiği düşünülmektedir. İlerleyen dönemde kaspazların otofajik süreçlerin hangi aşamasında etkin olduğunu öğrenmek amacıyla daha detaylı araştırmaların yapılması önem arz etmektedir.

20HE ile bağlantılı protein ekspresyonlarından EcR-B1'e ilişkin veriler incelendiğinde, juvenil hormonun larval yağ doku EcR-B1 ekspresyonu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. 5 µg fenoksikarb uygulamasının, EcR-B1 ekspresyonunu, larval-larval deri değişiminde baskıladığı tespit edilmiştir. Hem kontrol hem de fenoksikarb uygulama grubunda tespit edilen en güçlü ekspresyon seviyeleri pupal evrede gerçekleşmiştir. Otofajik hücre ölümü markırlarıyla değerlendirildiğinde,

ekdizonun yağ dokunun yeniden şekillenmesini EcR-B1 aracılığıyla transkripsiyonel seviyede kontrol ettiği sonucu elde edilmiştir.

Floresan boyamalarda trofositlerde sitosölde beliren ışımaların kaynağının, pupal safha ilerledikçe “yaşlanma pigmenti” olarak isimlendirilen lipofuksin pigment birikimi olduğu, transmisyon elektron mikroskobu incelemeleriyle de doğrulanmıştır. Yağ doku hücrelerinin otofloresan ışımaya yapabildiği de ileriki çalışmalarda göz önünde bulundurulmalıdır.

Tüm çalışmalar ve elde ettiğimiz sonuçlar göz önüne alınarak değerlendirildiğinde, lepidopterlerde yağ dokunun yeniden şekillenmesinin zamanlamasında ve etkili mekanizmaları hakkında genelleme yapılmasının mümkün olmadığı görülmektedir. Bu konuda farklı türler arasında, hatta aynı türü çalışsan farklı araştırmacılar arasında bile fikir ayrılıkları mevcuttur. Sonuç olarak; *Galleria mellonella*'da gerçekleştirilen bu çalışma yağ dokunun yeniden şekillenmesi üzerine alternatif bir model oluşturduğu gibi ekonomik anlamda zararlı bir türün biyolojisi üzerine yapılmış kapsamlı bir çalışma olarak da önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ellis, J.D., Graham, J.R., Mortensen, A. Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research*. 2013, 52(1): 1-17.
2. Karlson, P. Biochemical Studies on Insect Hormones, in *Vitamins & Hormones*, Harris, R.S., Marrian, G.F., and Thimann, K.V., Editors. 1956, Academic Press. p. 227-266.
3. Sehgal, R.E., Meyer, A. S. Larval-pupal transformation: control by juvenile hormone. *Science*, 1968, 159(3818): 981-4.
4. Richman, K., Oberlander, H. Effects of fat body on α -ecdysone induced morphogenesis in cultured wing disks of the wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 1971, 17(2): 269-276.
5. Nijhout, H., *Insect hormones*. Insect hormones., 1994.
6. Parthasarathy, R., Palli, S. R. Molecular analysis of juvenile hormone analog action in controlling the metamorphosis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2009, 70(1): 57-70.
7. Kaneko, Y., Yasanga, T., Suzuki, M., Sakurai, S. Larval fat body cells die during the early pupal stage in the frame of metamorphosis remodeling in *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57(12): 1715-22.
8. Larsen, W.J. Cell remodeling in the fat body of an insect. *Tissue Cell*, 1976, 8(1): 73-92.
9. Haunerland, N.H., Shirk, P.D. Regional and Functional Differentiation in the Insect Fat Body. *Annual Review of Entomology*, 1995, 40(1): 121-145.
10. Liu, Y., Liu, H., Liu, S., Wang, S., Jiang, R.J., Li, S. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology*, 2009, 71(1): 16-30.
11. Gui, Z.Z., Lee, K.S., Kim, B.Y., Choi, Y.S., Wei, Y.D., Choo, Y.M., Kang, P.D., Yoon, H.J., Kim, I., Je, Y.H., Seo, S.J., Lee, S.M., Guo, X., Sohn, H.D., Jin, B.R. Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis. *BMC Developmental Biology*, 2006, 6.
12. Sumithra, P., Britto, C.P., Krishnan, M. Modes of cell death in the pupal perivisceral fat body tissue of the silkworm *Bombyx mori* L. *Cell and Tissue Research*, 2010, 339(2): 349-58.

13. Wang, Z.X., Haunerland, N.H. Fate of Differentiated Fat-Body Tissues during Metamorphosis of *Helicoverpa zea*. *Journal of Insect Physiology*, 1992, 38(3): 199-213.
14. Muller, F., Adori, C., Sass, M. Autophagic and apoptotic features during programmed cell death in the fat body of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *European Journal of Cell Biology*, 2004, 83(2): 67-78.
15. Beck, S.D. Neural and Hormonal Control of Pupation in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Galleriidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 1970, 63(1): 144-149.
16. Bollenbacher, W.E., Zvenko, H., Kumaran, A.K., Gilbert, L.I. Changes in ecdysone content during postembryonic development of the wax moth, *Galleria mellonella*: the role of the ovary. *General and Comparative Endocrinology*, 1978, 34(2): 169-79.
17. Maróy, P. and Tarnóy, K. Moulting hormone level during the last instar of *Galleria mellonella* larva. *Journal of Insect Physiology*, 1978, 24(4): 325-327.
18. Plantevin, G., De Reggi M., Nardon, C. Changes in Ecdysteroid and Juvenile Hormone Titters in the Hemolymph of *Galleria mellonella* Larvae and Pupae. *General and Comparative Endocrinology*, 1984, 56: 218-230.
19. Sehnal, F., Delbecque, J.P., Maróy P, Mala, J. Ecdysteroid titres during larval life and metamorphosis of *Galleria mellonella*. *Insect Biochemistry*, 1986, 16(1): 157-162.
20. Rembold, H. Sehnal, F. Juvenile hormones and their titer regulation in *Galleria mellonella*. *Insect Biochemistry*, 1987, 17(7): 997-1001.
21. Bronskill, J., A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal The Lepidopterists' Society*., 1961. 15: 102-104.
22. Somerville, D., Wax moth. *Primefact*. 658: 1-4.
23. Paddock, F.B. *The Beemoth Or Waxworm*. Texas Agricultural Experiment Stations. 1918
24. Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 1997, 88(3): 347-54.
25. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972, 26(4): 239-57.

26. Lockshin, R.A., Zakeri, Z. Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(12): 2405-19.
27. Akşit, H., Bildik, A. Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008, 19(1): 55-63.
28. Güleş, Ö., Eren, Ö. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008(2): 72-78.
29. Kiess, W., Gallaher, B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology*, 1998, 138(5): 482-91.
30. Karalezli I., Aladağ, M. O. Apoptozis. *International Journal of Scientific and Technological Research* 2016, 2(1): 32-36.
31. Boatright, K.M. and Salvesen, G.S. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(6): 725-31.
32. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407(6805): 770-6.
33. Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 1997, 326(1): 1-16.
34. Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, T. *Moleküler Biyoloji: Protein Sentezi ve Yıkımı*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2007, 300.
35. Prokhorova, E.A., Zamaraev, A.V., Kopeina, G.S., Zhivotovsky, B., Lavrik, I.N. Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 72(23): 4593-4612.
36. Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2001, 2(1): 91-95.
37. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*, 2000, 256(1): 12-8.
38. Sokolowski, J.D., Gamage, K.K., Heffron, D.S., Leblanc, A.C., Deppmann, C.D., Mandell, J.W. Caspase-mediated cleavage of actin and tubulin is a common feature and sensitive marker of axonal degeneration in neural development and injury. *Acta Neuropathol Commun*, 2014, 2: 16.
39. Cohen, J.J. Apoptosis. *Immunol Today*, 1993, 14(3): 126-30.
40. Arslan, D.Ö., Korkmaz, G., and Gözüaçık, D. Otofaji Bir Hücreyel Stres Yanıtı ve Ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2011, 2(4): 184-194.
41. Tian, L. and Li, S. Autophagy studies in *Bombyx mori*. Vol. 12. 2015, 103-108.

42. Locke, M., Collins, J.V. The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. *The Journal of Cell Biology*, 1965, 26(3): 857-884.
43. Yang, Z., Klionsky, D.J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(2): 124-31.
44. Codogno, P., Meijer, A. J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death & Differentiation*, 2005, 12 Suppl 2: 1509-18.
45. Scott, R.C., Schuldiner, O., Neufeld, T.P. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental Cell*, 2004, 7(2): 167-78.
46. Xie, Z., Klionsky, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 2007, 9(10): 1102-9.
47. Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., Ohsumi, Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, 2003, 5(4): 539-45.
48. Mukhopadhyay, S., Panda, P.K., Sinha, N., Das, D.N., Bhutia, S.K. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, 2014, 19(4): 555-566.
49. Liu, H., Wang, J., Li, S. E93 predominantly transduces 20-hydroxyecdysone signaling to induce autophagy and caspase activity in *Drosophila* fat body. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 45: 30-9.
50. Yin, V.P. and Thummel, C.S. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2005, 16(2): 237-43.
51. Tsapras, P., Nezis, I.P. Caspase involvement in autophagy. *Cell Death & Differentiation*, 2017, 24(8): 1369-1379.
52. Martin, D. N., Baehrecke, E.H. Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development*, 2004, 131(2): 275-84.
53. Chapman, R. F., Chapman, R. F. *The insects: structure and function*. Cambridge university press. 1998.
54. Furtado, W. C. A., Azevedo, D. O., Martins, G. F., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. Histochemistry and Ultrastructure of Urocytes in the Pupae of the Stingless Bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini). *Microscopy and Microanalysis*, 2013, 19(6): 1502-1510.

55. Locke, M. Cell structure during insect metamorphosis, in *Metamorphosis*. Springer. 1981, p. 75-103.
56. Liu, H., Jia, Q., Tettamanti, G., Li, S. Balancing crosstalk between 20-hydroxyecdysone-induced autophagy and caspase activity in the fat body during *Drosophila* larval-prepupal transition. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(11): 1068-1078.
57. Goncu, E. and Parlak, O. Some autophagic and apoptotic features of programmed cell death in the anterior silk glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Autophagy*, 2008, 4(8): 1069-1072.
58. Franzetti, E., Huang, Z.J., Shi, Y.X., Xie, K., Deng, X.J., Li, J.P., Li, Q.R., Yang, W.Y., Zeng, W.N., Casartelli, M., Deng, H.M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q.Y., Tettamanti, G., Cao, Y., Feng, Q.L. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, 2012, 17(3): 305-324.
59. Goncu, E., Parlak, O. The effect of the juvenile hormone analog, fenoxycarb, on ecdysone receptor B1 expression in the midgut of *Bombyx mori* during larval-pupal metamorphosis. *Folia Histochemistry Cytobiology*, 2012, 50(1): 52-7.
60. Sumithra, P., Raman, C., Krishnan, M. Autophagic programmed cell death in the peripheral fat body tissues of the silkworm, *Bombyx mori* L. 2009, Vol 1, 159-173.
61. Nelliott, A., Bond, N., Hoshizaki, D. K. Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. *Genesis*, 2006, 44(8): 396-400.
62. Uwo, M.F., Ui-Tei, K., Park, P., Takeda, M. Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. *Cell Tissue Res*, 2002, 308(2): 319-31.
63. Aguila, J. R., Suszko, J., Gibbs, A. G., Hoshizaki, D. K. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 2007, 210(6): 956-63.
64. Riddiford, L. M. Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. In *Advances in insect physiology*. Academic Press. 1994, Vol. 24, pp. 213-274.
65. Jindra, M., Malone, F., Hiruma, K., Riddiford, L. M. Developmental Profiles and Ecdysteroid Regulation of the mRNAs for Two Ecdysone Receptor

- Isoforms in the Epidermis and Wings of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology*, 1996, 180(1): 258-272.
66. Hsiao, T.H., Hsiao, C. Simultaneous determination of molting and juvenile hormone titers of the greater wax moth. *Journal of Insect Physiology*, 1977, 23(1): 89-93.
 67. Hwang-Hsu, K., Reddy, G., Kumaran, A.K. Correlations between juvenile hormone esterase activity, ecdysone titre and cellular reprogramming in *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 1979, 25(1): 105-111.
 68. Sehnal, F., Maróy, P., Malá, J. Regulation and significance of ecdysteroid titre fluctuations in lepidopterous larvae and pupae. *Journal of Insect Physiology*, 1981, 27(8), 535-544.
 69. Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J. T., and Rees, H. 3.3 - Ecdysteroid Chemistry and Biochemistry A2 - Gilbert, Lawrence I, in *Comprehensive Molecular Insect Science*. 2005, Elsevier: Amsterdam. p. 125-195.
 70. Butenandt, A., Karlson, P. Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form, in *Zeitschrift für Naturforschung B*. 1954. p. 389.
 71. Gilbert, L. I., King, D.S. Physiology of growth and development: endocrine aspects, in *The Physiology of Insecta (Second Edition)*, Elsevier. 1973, Vol I. 249-370.
 72. Goncu, E., Parlak, O. Fenoxycarb modulates ecdysone receptor B1 and programmed cell death of the anterior silk gland of silkworm *Bombyx mori*. *Entomological Science*, 2011, 14(2): 173-182.
 73. Batır E., Göncü E., Parlak, O. Ecdysone receptor B1 in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera:Bombycidae) prothoracic gland under various organ culture conditions. *IUFS Journal of Biology*, 2012, 72(1): 31-42.
 74. Jindra, M., Riddiford, L.M. Expression of ecdysteroid-regulated transcripts in the silk gland of the wax moth, *Galleria mellonella*. *Development Genes Evolution*, 1996, 206(5): 305-14.
 75. Henrich, V.C. The Ecdysteroid Receptor, ed. Gilbert LI, I.K.G.S. *Comprehensive Molecular Insect Science*: Elsevier. 2005, 243-285.

76. Yao, T.P., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M., Evans, R.M. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, 1992, 71(1): 63-72.
77. Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.D., McKeown, M., Cherbas, P., Evans, R.M. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature*, 1993, 366(6454): 476-9.
78. Swevers, L., Cherbas, L., Cherbas, P., Iatrou, K. *Bombyx* EcR (BmEcR) and *Bombyx* USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 26(3): 217-221.
79. Jindra, M., Huang, J. Y., Malone, F., Asahina, M., Riddiford, L. M. Identification and mRNA developmental profiles of two ultraspiracle isoforms in the epidermis and wings of *Manduca sexta*. *Insect Molecular Biology*, 1997, 6(1): 41-53.
80. Schwedes, C., Tulsiani, S., Carney, G. E. Ecdysone receptor expression and activity in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57(7): 899-907.
81. Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segraves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P., Hogness, D. S. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, 1991, 67(1), 59-77.
82. Talbot, W. S., Swyryd, E. A., Hogness, D. S. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, 1993, 73(7): 1323-37.
83. Fujiwara, H., Jindra, M., Newitt, R., Palli, S.R., Hiruma, K., Riddiford, L.M. Cloning of an ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and the developmental profile of its mRNA in wings. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 25(7): 845-56.
84. Kamimura, M., Tomita, S., Fujiwara, H. Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 Isoform) homologue from the silkworm, *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disc development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 113(2): 341-347.
85. Göncü, E. İpekböceği *Bombyx mori* (Lepidoptera:Bombycidae) anterior ipek bezinde programlanmış hücre ölümüne juvenil hormon analogu fenoxycarb'in etkisi. 2006, Ege Üniversitesi. p. 258.

86. Beckage, N. E. Insect Growth Regulators. CRC press LLC. 2000, Vol 5.123-137.
87. Grenier, S., Grenier, A. M. Fenoxycarb, a fairly new Insect Growth Regulator: review of its effects on insects. *Annals of Applied Biology*, 1993, 122(2): 369-403.
88. Dedos, S. G., Szurdoki, F., Székács, A., Shiotsuki, T., Hammock, B. D., Shimada, J., Fugo, H. Fenoxycarb levels and their effects on general and juvenile hormone esterase activity in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2002, 73(3): 174-187.
89. Goncu, E., Uranlı, R., Parlak, O. Juvenile hormone analogue, fenoxycarb, modulates ecdysone-triggered transcriptional hierarchy during programmed cell death of midgut in silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *EJE*, 2017, 114(1): 235-248.
90. Davey, K. G., Gordon, D. R. Fenoxycarb and thyroid hormones have JH-like effects on the follicle cells of *Locusta migratoria* in vitro. *Archive Insect Biochemistry and Physiology*, 1996, 32(3-4): 613-22.
91. Lee, K. S., Kim, B. Y., Choo, Y. M., Yoon, H. J., Kang, P. D., Woo, S. D., Sohn, H. D., Roh, J. Y., Gui, Z. Z., Je, Y. H., Jin, B. R. Expression profile of cathepsin B in the fat body of *Bombyx mori* during metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, 2009, 154(2): 188-94.
92. Tian, L., Liu, S., Liu, H., Li, S. 20-hydroxyecdysone upregulates apoptotic genes and induces apoptosis in the *Bombyx* fat body. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2012, 79(4-5): 207-19.
93. Fujiwara, H., Ogai, S. Ecdysteroid-induced programmed cell death and cell proliferation during pupal wing development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development Genes & Evolution*, 2001, 211(3).
94. Zaugg, M., Jamali, N. Z., Lucchinetti, E., Xu, W., Alam, M., Shafiq, S. A., Siddiqui, M. A. Q. Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *Journal of cellular physiology*, 2001, 187(1), 90-95.
95. Jiang, C., Baehrecke, E. H., & Thummel, C. S. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila metamorphosis*. *Development*, 1997, 124(22), 4673-4683.

96. Bang, M. S., Lim, J. H., & Kim, D. Y. Effects of Exercise and Steroid on Apoptosis in Skeletal Muscle of Mdx Mouse. *Journal of Korean Academy of Rehabilitation Medicine*, 2003, 27(2), 232-239.
97. Khoa, D. B., Trang, L. T., Takeda, M. Expression analyses of caspase-1 and related activities in the midgut of *Galleria mellonella* during metamorphosis. *Insect Mol Biol*, 2012, 21(2): 247-56.
98. Karnovsky, M. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. *The Journal of Cell Biology* 1965, 27: 137-144.
99. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 1963, 17: 208-12.
100. Denton, D., Kumar, S. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) for Detection of Apoptotic Cells in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015, 2015(6): 568-71.
101. Bergmeyer, H. U. Enzymes as biochemical reagents. Hexokinase. *Methods of enzymatic analysis*. 1974, 1: 425-522.
102. Elmogy, M. Localization and expression profiles of *Bombyx mori* ecdysone receptor-B1 in the fat body cells undergoing programmed cell death. *Efflatounia*, 2008, 8: 29-37.
103. Dutkowski, A. B. The ultrastructure and ultracytochemistry of the basement membrane of the *Galleria mellonella* fat body. *Cell and tissue research*, 1977, 176(3), 417-429.
104. Chazotte, B. Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, 2011(1), pdb-prot5556.
105. Kamimura, M., Kiuchi, M. Effects of a juvenile hormone analog, fenoxycarb, on 5th stadium larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Applied Entomology and Zoology*, 1998, 33(2): 333-338.
106. Retnakaran, A. Hormonal induction of supernumerary instars in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *The Canadian Entomologist*, 1973, 105(3): 459-461.
107. Ciemior, K.E., Sehnal, F., Schneiderman, H.A. Molting, Growth and Survival of *Galleria mellonella* L. (Lep, Pyralidae) Treated with Juvenoids. *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie-Journal of Applied Entomology*, 1979, 88(4): 414-425.

108. Sehnal, F., Janda, V., Němec, V. Composition, synthetic and cytolytic activities of *Galleria mellonella* silk glands during the last-larval instar under the action of juvenile hormone. *Journal of Insect Physiology*, 1983, 29(3): 237-248.
109. Singh, P., Dugdale, J., Morphogenetic and physiological effects of a juvenile hormone analogue on the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). Vol. 6. 1979. 381-387.
110. Gadenne, C., Grenier, S., Plantevin, G., Mauchamp, B., Effects of a juvenile hormone mimetic, fenoxycarb, on post-embryonic development of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. Hbn. *Experientia*, 1991. 46(7): 744-747.
111. Sehnal, F., Schneiderman, H. Action of the corpora allata and of juvenilizing substances on the larval-pupal transformation of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera). *Acta Entomology Bohemoslov.*, 1973, 70: 289-302.
112. Brieger, G. Juvenile hormone analogue in diet of the waxmoth *Galleria mellonella*. *Naturwissenschaften*, 1973, 60(5): 261-261.
113. Srivastava, U., Srivastava, R., Prasad, S., Srivastava, P. Endocrinological adaptations in insects. *Experientia*, 1979, 35(10): 1301-1302
114. Srivastava, U., Srivastava, R. Juvenoid-induced supernumerary larval instars in certain stored grain insects. *Proceedings: Animal Sciences*, 1983, 92(3): 263-276.
115. Sehnal, F., Granger, N.A. Control of corpora allata function in larvae of *Galleria mellonella*. *Biology Bulletin*, 1975, 148(1): 106-16.
116. Plantevin, G. Contribution a l'ttude de la biologie de *Galleria mellonella*: Mues., croissance et developpement. *Annls Zool. Ecol. Anim.*, 1975, 7: 365-398.
117. Beck, S.D. Growth and Development of The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera:Galleriidae). *Visconsin Academy of Sciences, Arts and Letters*, 1960, 49: 137-148.
118. Young, R.G. Lipids of the Larva of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. Vol. 57. 1964, 321-324.
119. Dadd, R.H. A study of carbohydrate and lipid nutrition in the wax moth, *Galleria mellonella* (L.), using partially synthetic diets. *Journal of Insect Physiology*, 1964, 10(2): 161-178.

120. Büyükgüzel, E., Tunaz, H., Stanley, D., Büyükgüzel, K. The influence of chronic eicosanoid biosynthesis inhibition on life history of the greater waxmoth, *Galleria mellonella* and its ectoparasitoid, *Bracon hebetor*. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57(4): 501-507.
121. Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O., Cogun, H.Y. Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 2013, 106(3): 371-377.
122. Coskun, M., Kayis, T., Sulanc, M., Ozalp, P. Effects of different honeycomb and sucrose levels on the development of greater wax moth *Galleria mellonella* larvae. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2006, 8(6): 855-858.
123. Dyar, H. G. The number of molts of lepidopterous larvae. *Psyche: A Journal of Entomology*, 1980, 5(175-176), 420-422.
124. Schmolz, E. Drutschmann, S., Schrickler, B., Lamprecht, I. Calorimetric measurements of energy contents and heat production rates during development of the wax moth *Galleria mellonella*. *Thermochimica Acta*, 1999, 337(1-2): 83-88.
125. Sehnal, F. Juvenile hormone action and insect growth rate. *Endocrinologia Experimentalis*, 1971, 5: 29-33.
126. Callier, V., Nijhout, H.F. Control of body size by oxygen supply reveals size-dependent and size-independent mechanisms of molting and metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(35): 14664-14669.
127. Zara, F.J., Caetano, F.H. Ultramorphology and histochemistry of fat body cells from last Instar larval of the *Pachycondyla* (=Neoponera) villosa (Fabricius) (Formicidae: Ponerinae). *Brazilian Journal of Biology*, 2004, 64: 725-735.
128. Bancroft, J. D., Gamble, M. (Eds.). *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences. 2008.
129. Poyraz, E., Göncü, E., Uranlı, R., Parlak, O. Investigation of the Interaction between Fat body and Ovary Development during Pupal Transformation in Silkworm, *Bombyx mori*. *IUFS Journal of Biology*, 2013, 72(2): 1-13.
130. Arrese, E.L. Soulages, J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 2010, 55: 207-25.

131. de Oliveira, V. P., Cruz-Landim, C. Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociências*, 2003, 11(2), 195-205.
132. Nagata, M., Kobayashi, J.U.N. Effects of Nutrition on Storage Protein Concentrations in the Larval Hemolymph of the Silkworm, "*Bombyx mori*". *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 1990, 59(6): 469-474.
133. Tojo, S., Kiguchi, K., Kimura, S. Hormonal control of storage protein synthesis and uptake by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 1981, 27(7): 491-497.
134. Nagata, M., Kobayashi, M. Quantitative Changes in Storage Proteins during Larval Development of the Silkworm, "*Bombyx mori*". *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 1990, 59(6): 461-468.
135. Vafopoulo, X., Steel C. G. H. Circadian organization of the Endocrine system. In *Insect Development, Morphogenesis, molting and metamorphosis*. York University, Toronto, ON, Canada. Elsevier. 2005, 395- 458.
136. Uranlı, R. İpek Böceği *Bombyx mori*'de Fenoksikarb Uygulaması Sonrasında Elektroforetik Farklılık Gösteren Hemolenf Proteinlerinin Tanımlanması, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2014, Ege Üniversitesi.
137. Hou, Y., Zou, Y., Wang, F., Gong, J., Zhong, X., Xia, Q., Zhao, P. Comparative analysis of proteome maps of silkworm hemolymph during different developmental stages. *Proteome Science*, 2010, 8: 45-45.
138. Tian, L., Ma, L., Guo, E., Deng, X., Ma, S., Xia, Q., Cao, Y., Li, S. 20-Hydroxyecdysone upregulates Atg genes to induce autophagy in the *Bombyx* fat body. *Autophagy*, 2013, 9(8): 1172-87.
139. Rusten, T.E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P.O. Brech, A., Stenmark, H., Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Developmental Cell*, 2004, 7(2): 179-92.
140. Zakeri, Z.F. Quaglino, D., Latham, T., Lockshin, R.A., Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *The FASEB Journal*, 1993, 7(5): 470-8.
141. Kamalidehghan, B., Ahmadipour, F., Noordin, M.I. DNA fragmentation is not associated with apoptosis in zerumbone-induced HepG2 cells. *Iran Biomed Journal*, 2012, 16(4): 226.

142. Brunk, U. T., Terman, A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 33(5), 611-619.
143. Warford, A.L., Steinberg, E. Newer Approaches to Perinatal Herpes Simplex Virus Testing, in *Medical Virology 8*. Springer. 1989, 1-21.
144. Yin, D., Brunk, U. Autofluorescent Ceroid/Lipofuscin, in *Free Radical and Antioxidant Protocols*, Armstrong, D., Editor. 1998, Humana Press: Totowa, NJ. p. 217-227.
145. Sun, D., McGinn, M., Hankins, J., Mays, K., Rolfe, A., Colello, R. Aging- and injury-related differential apoptotic response in the dentate gyrus of the hippocampus in rats following brain trauma. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2013, 5(95).
146. Tracy, K. Baehrecke, E.H. The role of autophagy in *Drosophila* metamorphosis. *Current Topics Developmental Biology*, 2013, 103: 101-25.
147. Tettamanti, G., Cao, Y., Feng, Q., Grimaldi, A., Eguileor, M. Autophagy in Lepidoptera: more than old wine in new bottle. *Insect Invertebrate Survival Journal*, 2011, 8(1): 5-14.
148. Mpakou, V.E., Nezis, I.P., Stravopodis, D.J., Margaritis, L.H., Papassideri, I.S. Different modes of programmed cell death during oogenesis of the silkworm *Bombyx mori*. *Autophagy*, 2008, 4(1): 97-100.
149. Levine, B., Klionsky, D.J. Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Developmental Cell*, 2004, 6(4): 463-477.
150. Sass, M., Komuves, L., Csikos, G., Kovacs, J. Changes in the activities of lysosomal enzymes in the fat body and midgut of two lepidopteran insects (*Mamestra brassicae* and *Pieris brassicae*) during metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1989, 92(3): 285-289.
151. Locke, M.T., Collins, J.V. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *The Journal of cell biology*, 1968, 36(3): 453-483.
152. Collins, J.V. Soluble acid phosphatases of the hemolymph and fat body of *Calpodes ethlius* (Stoll) and the control of protein storage by fat body. *Canadian Journal of Zoology*, 1975, 53(4): 480-489.

153. Rabossi, A., Stoka, V., Puizdar, V., Turk, V., Quesada-Allue, L.A. Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitis capitata* early metamorphosis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2004, 57(2): 51-67.
154. Cakouros, D., Daish, T.J., Kumar, S. Ecdysone receptor directly binds the promoter of the *Drosophila* caspase *dronc*, regulating its expression in specific tissues. *The Journal of cell biology*, 2004, 165(5): 631-640.
155. Kamimura, M., Tomita, S., Kiuchi, M., Fujiwara, H. Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 248(3): 786-93.
156. Hossain, M., Shimizu, S., Fujiwara, H., Sakurai, S., Iwami, M. EcR expression in the prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells of the *Bombyx mori* brain. *FEBS J*, 2006, 273(16): 3861-8.
157. Riddiford, L.M., Truman, J.W. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *American Zoologist*, 1993, 33(3): 340-347.
158. Henrich, V.C., Szekely, A.A., Kim, S.J., Brown, N.E., Antoniewski, C., Hayden, M.A., Lepesant, J.A., Gilbert, L.I. Expression and function of the ultraspiracle (*usp*) gene during development of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 1994, 165(1): 38-52.
159. Riddiford, L.M., Cherbas, P., Truman, J.W. Ecdysone receptors and their biological actions, in *Vitamins & Hormones*. Academic Press. 2000, 1-73.
160. Hegstrom, C.D., Riddiford, L.M., Truman, J.W. Steroid and neuronal regulation of ecdysone receptor expression during metamorphosis of muscle in the moth, *Manduca sexta*. *J Neurosci*, 1998, 18(5): 1786-94.
161. Tan, A., Palli, S.R. Ecdysone receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 291(1): 42-49.
162. Riddiford, L.M., Hiruma, K., Que, L., Baohua, Z. Regulation and Role of Nuclear Receptors during Larval Molting and Metamorphosis of Lepidoptera. *American Zoologist*, 1999, 39(4): 736-746.
163. Hiruma, K., Shinoda, T., Malone, F., and Riddiford, L.M. Juvenile hormone modulates 20-hydroxyecdysone-inducible ecdysone receptor and ultraspiracle

- gene expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Development Genes and Evolution*, 1999, 209(1): 18-30.
164. Kadono-Okuda, K., Kajiura, Z., Yamashita, O. Induction of perfect superlarvae by the application of juvenile hormone analogue to starved larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 1986, 32(12): 1065-1073.
 165. Thormeyer, D., Tenbaum, S.P., Renkawitz, R., Baniahmad, A. EcR interacts with corepressors and harbours an autonomous silencing domain functional in both *Drosophila* and vertebrate cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 68(3-4): 163-9.
 166. Stoven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engstrom, Y., Maniatis, T., Hultmark, D. Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(10): 5991-6.
 167. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death And Differentiation*, 2014, 22: 526.
 168. Kuranaga, E., Miura, M., Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends in Cell Biology*, 2007, 17(3): 135-144.
 169. Fujita, J., Crane, A.M., Souza, M.K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R.A., Thomson, J.A., Zwaka, T.P. Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6): 595-601.
 170. Janzen, V., Fleming, H.E., Riedt, T., Karlsson, G., Riese, M.J., Lo Celso, C., Reynolds, G., Milne, C.D., Paige, C.J., Karlsson, S., Woo, M., Scadden, D.T. Hematopoietic stem cell responsiveness to exogenous signals is limited by caspase-3. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6): 584-94.
 171. Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D.R., Bedford, J.S., Li, C.Y. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Science Signal*, 2010, 3(110): ra13.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esen POYRAZ TINARTAŞ

Doğum Yeri ve Yılı : Ankara, 1983

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : esen.poyraz@cbu.edu.tr; esen.poyraz@yahoo.com

Eğitim Durumu

Lise : Selma Yiğitalp Lisesi, 2001

Lisans : Dokuz Eylül Üniversitesi, Buca Eğitim Fakültesi, Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanlar Eğitimi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü, 2007

Yüksek Lisans : Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 2010

Mesleki Deneyim

Kurum bilgisi : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü 2009-

Yayınlar

1. Koc, K., Poyraz-Tınartaş E. P. *Storchia mehrvari*, a new record of the genus *Storchia* Oudemans, 1923 (Acari: Stigmaeidae) from Turkey and its abnormalities of genital and aggenital setae. *Turkish Journal of Zoology*, 2017, 41 (2), 318-322.
2. Koç, K., Poyraz-Tınartaş, E. P. Gölarmara ilçesi (Manisa) Raphignathoidea (Acari) üst familyasına ait akarların mevsimsel dağılımları. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2017, 2 (1), 93-106.
3. Poyraz, E., Göncü, E., Parlak, O. Investigation of the interaction between fat body and ovary development during pupal transformation in silkworm, *Bombyx mori*, *Istanbul University Journal of Biology*, 2013, 72 (2), 1-13.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Poyraz-Tınartaş, E., Göncü, E., Koç, K., 2018, Effects of an Insect Growth Regulator, Fenoxycarb, on 7th instar larvae of Greater Wax moth, *Galleria mellonella*, *Ecology* 2018, June, 19-23, Kastamonu, abstract page 620. (Sözlü Bildiri)

2. Poyraz-Tınartaş, E., Göncü, E., Koç, K., 2017, Effect of Fenoxycarb on Insects and NonTarget Organisms, Uluslararası ve Disiplinlerarası Çevre ve Edebiyat sempozyumu, November, 1-3, Manisa. (Sözlü Bildiri)
3. Poyraz-Tınartas E., Göncü E., Koc K., 2016, Autophagic cell death features of periviseral fat body remodeling of greater wax moth *Galleria mellonella* during larval-pupal transformation., 41st FEBS Congress, September 3-8, Kuşadası Turkey. (Speed talk), abstract page 101.
4. Poyraz E., Göncü E., Uranlı R., Parlak O., 2010, The effects of juvenile hormone analogue, fenoxycarb, on testis development of *Bombyx mori* during larval-pupal development, International conference on invertebrate reproduction and development in the age of genetic modifications, August 16-20, 2010, Prague. (Sözlü bildiri)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Poyraz E., Göncü E., Koç K., 2014, *Galleria mellonella* 7. instar Larvalarında (Lepidoptera: Pyralidae) Juvenil Hormon Analogu Fenoksikarb'ın Periviseral Yağ Doku Histolojisi ve Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkisi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, sf 1054 (Poster).
2. Poyraz E., Uranlı R., Selek G., Göncü E., Parlak O., 2013, *Bombyx mori*'de Pupal metamorfozda periviseral yağ dokuda meydana gelen yeniden yapılanma sürecinin incelenmesi, 1. Ulusal Zooloji Kongresi, 28-31 Ağustos, Nevşehir, sf. 14 (Sözlü bildiri).
3. Poyraz-Tınartaş E., Göncü E., Uranlı R., Parlak O., 2012, 5. Larval Evrenin 3. Günü Uygulanan Juvenil Hormon Analogu Fenoksikarbın Testis Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir, sf. 1072-1073. (Poster)
4. Poyraz E., Koç K., 2011, Kenelerin (Acari, Parasitiformes) üreme ve gelişiminde hormonların etkisi, X. Ulusal ekoloji ve çevre kongresi, 4- 7 Ekim 2011, Çanakkale, sf. 311. (Poster)
5. Poyraz E., Göncü E., Uranlı R., Parlak O., 2010, İpekböceği *Bombyx mori*'de pupal evre boyunca yağ doku protein profilleri ve ovaryum gelişimi arasındaki bağlantının araştırılması, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Denizli, sf. 718-719. (Poster)