

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İPEKBÖCEĞİ *BOMBYX MORI*'DE
LARVAL-PUPAL GELİŞİM SÜRESİNCE
JUVENİL HORMON ANALOĞU FENOKSİKARB'IN
POSTERİOR İPEK BEZİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dilek DERTLİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman PARLAK

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.04.00

Sunuş Tarihi : 17.03.2015

Bornova-İZMİR

2015

Dilek Dertli tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**İpekböceği *Bombyx mori*’de larval-pupal gelişim süresince juvenil hormon analogu fenoksikarb’ın posterior ipek bezi üzerine etkisi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 17 Mart 2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :Prof. Dr. Osman PARLAK

Raportör Üye : Doç. Dr. N. Ebru GÖNCÜ

Üye : Doç. Dr. Selma KATALAY

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**İpekböceği *Bombyx mori*’de larval-pupal gelişim süresince juvenil hormon analogu fenoksikarb’ın posterior ipek bezi üzerine etkisi.**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

17/03/2015

İmzası

Adı-Soyadı

Dilek Dertli

ÖZET

**İPEKBÖCEĞİ *BOMBYX MORI*'DE
LARVAL-PUPAL GELİŞİM SÜRESİNCE
JUVENİL HORMON ANALOĞU FENOKSİKARB'IN
POSTERİOR İPEK BEZİ ÜZERİNE ETKİSİ**

DERTLİ, Dilek

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman PARLAK

Mart 2015; 43 sayfa

İpek bezi ipek böceği *Bombyx mori*'de tüm vücut boyunca devam eden bir yapıya sahiptir ve larval pupal metamorfoz sırasında dejenere olur. Endokrin sistem tarafından kontrol edilen bu dejenerasyon programlanmış hücre ölümü yoluyla gerçekleşir. Bu süreci denetleyen başlıca iki hormon 20-hidroksiekdizon ve juvenil hormondur.

İpek bezi ektoderm orijinli bir doku olup dallanmış yapıdaki nukleusları ile karakterize edilir. Bezin posterior ucu kapalıdır. Anterior uç ise ön taraftan dışarı açılmadan hemen önce birleşerek ipek salgısının tek bir iplik halinde dışarı çıkmasını sağlar. Posterior ipek bezi fibroin proteinin salgılanmasından sorumludur.

Endokrin sistemin posterior ipek bezinde larval-pupal dönemde meydana gelen metamorfik değişimler ile arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için son larval dönemin başında tek dozda juvenil hormon analogu fenoksikarb uygulaması yapılmıştır.

Çalışmamızda histolojik teknikler kullanılarak larval-pupal metamorfoz süresince posterior ipek bezindeki morfolojik değişimler gösterilmiştir. Lizozomal bir enzim olan asit fosfataz enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Bunlarla birlikte sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile posterior ipek bezindeki total protein profili ortaya koyulmuştur. Çalışmada ipek böceği *Bombyx mori* posterior ipek bezindeki programlanmış hücre ölümü sürecinde endokrin sistemin rolü araştırılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Bombyx mori*, fenoksikarb, ipek bezi, apoptoz, otofaji, asit fosfataz, SDS-PAGE.

ABSTRACT

**THE EFFECT OF JUVENILE HORMONE ANALOG
FENOXYCARB
ON THE POSTERIOR SILK GLAND
DURING LARVAL PUPAL DEVELOPMENT PERIOD
OF SILKWORM *BOMBYX MORI***

DERTLİ, Dilek

MSc in Biology
Supervisor: Prof. Dr. Osman PARLAK
March 2015, 43 pages

Silk gland has a structure which continues through the body on the silkworm *Bombyx mori* and it is degenerated during the larval pupal metamorphosis. This degeneration controlled by the endocrine system occurs via programmed cell death. The two main hormones that control this process are 20-hydroxyecdysone and juvenile hormones.

The silk gland is an ectodermal originated tissue which is characterized by nuclei with branched structure. The posterior side of the gland is closed. On the other hand the anterior side provides release out the silk secretion in a single fiber by combining just before the opening out the of the front. Posterior silk gland is responsible for the secretion of fibroin protein.

In order to identify the relation between endocrine system and the metamorphic changes in posterior silk gland during larval-pupal metamorphosis, juvenile hormone analogue fenoxycarb was applied with a single dose at the beginning of the last larval stage.

In our study, the morphological changes in the posterior silk gland were shown during larval-pupal metamorphosis by using histological techniques. The activity of acid phosphatase enzyme, which is a lysosomal enzyme, was measured. Furthermore, the total protein profile of the posterior silk gland was revealed by the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. In the study, the role of the endocrine system was investigated during the programmed cell death in the posterior silk gland of silkworm *Bombyx mori*.

Keywords: *Bombyx mori*, fenoxycarb, silk gland, apoptosis, autophagy, acid phosphatase, SDS-PAGE.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince değerli bilgi ve katkılarını esirgemeyen danışmanım, Sayın Hocam Prof. Dr. Osman PARLAK’a, çalışmamın her safhasında desteğini yanımda hissettiğim bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli Hocam Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ’ye teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarıyla tezimin her aşamasında yanımda olan Sayın Ramazan Uranlı ve Gözde Selek’e, Zooloji Anabilim Dalı çalışanlarına ve lisansüstü eğitim yapmakta olan arkadaşlarıma ve 2013 FEN 05 Numaralı proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığına teşekkürü bir borç bilirim. vii

Ayrıca çalışmamı gerçekleştirmemde güvenlerini ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli aileme teşekkürlerimi ve şükranlarını sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1.GİRİŞ	1
2. MATEYAL VE METOT	5
2.1 Materyal	5
2.1.1 Deney hayvanları.....	5
2.1.2. Deneyde kullanılan juvenil hormon analogu	5
2.2. Metod	6
2.2.1. İpek böceklerinin yetiştirilmesi.....	6
2.2.2. Fenoxycarb uygulaması.....	6
2.2.3. Posterior ipek bezlerinin alınması	7
2.2.4. Histolojik incelemeler	7
2.2.5. Total protein miktarları tayini	10

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.6. Asit fosfataz enzim aktivitesi incelemeleri.....	11
2.2.7. Elektroforez	11
3.BULGULAR	15
3.1. Histolojik Bulgular	15
3.1.1. Kontrol grubu	15
3.1.2. Uygulama grubu	17
3.2. Total Protein Tayini Bulguları.....	20
3.3.Enzim Aktivitesi Bulguları.....	22
3.4. Elektroforetik Bulgular.....	26
4.TARTIŞMA.....	34
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Larvada posterior ipek bezinin genel görünümü.....	16
3.2 Pupada posterior ipek bezinin genel görünümü	17
3.3 Uygulama grubu örneklerinde posterior ipek bezinin genel görünümü.	18
3.4 Uygulama grubu örneklerinde posterior ipek bezinin genel görünümü.	19
3.5 Uygulama grubu pupada posterior ipek bezinin genel görünümü	20
3.6 Total protein tayini standart grafiği.....	21
3.7 Kontrol ve grubundaki total protein tayini grafiği	22
3.8 Uygulama grubundaki total protein tayini grafiği.....	22
3.9 Enzim aktivitesi standart grafiği	23
3.10 Kontrol grubu enzim aktivitesi bulguları	24
3.11 Uygulama grubu enzim aktivitesi bulguları	24
3.12 Kontrol grubu spesifik enzim aktivitesi bulguları.....	25
3.13 Uygulama grubu spesifik enzim aktivitesi bulguları.....	25
3.14a Posterior ipek bezi protein profilleri.....	28

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.14b Posterior ipek bezi protein profilleri.....	29
3.15 15 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri	30
3.16 18 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri	30
3.17 26 kDa protein bandının (fibroin proteini) nispi yoğunluğu yüzdeleri	31
3.18 34 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri	31
3.19 42 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri	32
3.20 56 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri	32
3.21 59 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri	33
3.22 130 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1 Total proteini tayini standart grafiği verileri	20
2 Total protein tayini bulguları.....	21
3 Enzim aktivitesi standart grafiği verileri	23
4 Enzim aktivitesi bulguları	24
5 Spesifik Enzim aktivitesi bulguları	25

1. GİRİŞ

İpek böceği *Bombyx mori* ticari olarak ipek salgısı ile büyük önem taşımasının yanında endokrinoloji araştırmaları için de klasik bir model organizmadır (Daimon et al., 2012).

Tüm kelebek türlerini içeren Lepidoptera ordosunda ipek üreten böceklerin bulunduğu iki familya mevcuttur: Bombycidae ve Saturniidae. Doğada yetişen ipek böceği *Bombyx mandarina* ile tez çalışmamızda model organizma olarak kullanılan evcil ipek böceği *Bombyx mori* Bombycidae familyasına dahil türlerdir.

İpek böceği *Bombyx mori* larval, pupal ve ergin dönemleri birbirinden tamamen farklı holometabol böceklerdendir. Larvalar yaklaşık 10 günlük bir inkübasyonun ardından yumurtadan çıkar ve 4 kez larva-larva deri değişimini gerçekleştirir. 5. larval evreye girdikten kısa bir süre sonra örme davranışı başlar ve 3 gün boyunca devam eder. Bundan sonraki 24 saatte larva-pupa deri değişimi meydana gelir (Matsuura et al., 1968). Pupalar 10-11 günün sonunda ergin hale geçer. Erginler uçuş davranışı göstermez ve ergin safhada yaklaşık olarak 6-10 gün geçiren hayvanlar daha sonra yumurtalarını bırakarak ölürler.

İpek bezi ipek böceği *Bombyx mori*'de tüm vücut boyunca devam eden uzun tüp şeklinde bir yapıya sahiptir ve bulunduğu vücut bölümüne göre adlandırılır; anterior ipek bezi, orta ipek bezi ve posterior ipek bezi. Bu kısımlardaki hücre sayıları larval dönemde cinsiyete ve soya bağlı olarak değişiklik gösterse de yaklaşık olarak anterior bölümde 300 hücre, orta bölümde 250 hücre ve posterior kısımda 500 hücre barındırmaktadır (Akai, 1984).

Anterior ipek bezinin salgı görevi yoktur, dışarı açılmadan hemen önce iki yandaki bezler birleşerek salgının iplik şeklinde dışarı çıkmasını sağlar. Orta ipek bezinin en önemli salgısı serisindir ve morfolojik olarak incelendiğinde diğer bölgelere göre daha geniş bir yapıya sahip olduğu görülür. Posterior ipek bezinin en önemli salgısı ise glisin, alanin, serin, tirozin gibi amino asitler bakımından zengin bir bileşim olan fibroin proteindir.

Fibroin ince, yumuşak, parlak, boyanma afinitesi, su emme kapasitesi, sıcaklık toleransı yüksek bir üründür (Mondal et al., 2007). Bununla birlikte fibroin ağır zincir (H-fibroin), hafif zincir (L-fibroin) proteinleri ile P25

glikoproteininden oluşan kompleks bir moleküldür (Fedic et al., 2003; Sehnalet al., 2004).

Bu protein salgılandıktan sonra middle ipek bezinde serisin ile kaplanır, anterior bölümden dışarı açılarak ipek salgısını oluşturur ve böceğin koza örmesini sağlar (Parlak, 2001).

İpek bezi 5. larval evrenin son günlerinde dejenere olmaya başlar. Bu dejenerasyon programlanmış hücre ölümü yoluyla gerçekleşir ve endokrin sistem hormonları ile kontrol edilir. Bu başkalaşım süreçlerinin gerçekleşmesini sağlayan en önemli hormonlar 20-hidroksiekdizon (20E) ve juvenil hormondur.

20E böceklerde deri değişimini uyaran steroid karakterli bir hormondur. Larval ve pupal dönemlerde ekdizonun birincil kaynağı protorasik bezdir. Böcek beyninin her iki hemisferinde bulunan nörosekresyon hücreleri tarafından sentezlenen protorasikotropik hormon (PTTH) larval ve pupal dönemde protorasik bezi ekdizon üretimi için uyarır. İlk olarak oluşan ekdizon pasif yapıdadır ve protorasik bezin periferisinde bir seri hidroksilasyon geçirerek aktif form olan 20E'ye dönüştürülür. Yetişkin dişilerde ovaryumlar birincil ekdisteroid kaynağıdır. 5. larval evre ve yetişkin dönemlerinde erkeklerin testisleri de hormonu üretme yeteneğine sahiptir. Üstelik son yapılan araştırmalarda oenocytler ve epidermiste ekdisteroidlerin üretiminde alternatif yapılar olarak ileri sürülmüştür (Delbecquet al., 1990; Lafont R et al., 2005).

Juvenil hormon (JH) corpus allatum denilen bir çift nörosekresyon bezi tarafından salgılanan, böceklerde üreme, gelişme ve davranış özelliklerinin kontrolünde önemli rol oynayan, sesquiterpenoid yapıda bir hormondur (Goodman and Granger, 2005). Hormon bu etkilerin tümünü hemolenfte proteinlerle kompleks bir bileşik oluşturarak dokulara ulaştıktan sonra gerçekleştirir (Suzuki et al., 2011). Juvenil hormon hücresel düzeyde aktif olmasını sağlayan iki mekanizmaya sahiptir. Bunlardan biri nukleus reseptörlerine bağlanmasını sağlayan steroid yapısı, diğeri ise hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasını sağlayan peptid yapısıdır (Henrick et al., 1976; Yamamoto et al., 1988).

Steroid karakterli 20-hidroksiekdizonun böcek fizyolojisinde etki mekanizmaları çokça çalışılmasına karşın juvenil hormon ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıda kalmıştır.

Son yıllarda ipek bezinde meydana gelen programlanmış hücre ölümüne ilişkin pek çok çalışma yapılmıştır. Ancak posterior ipek bezinde meydana gelen bu dejenerasyona juvenil hormonun etkisi ile ilgili bilgi bulunmamaktadır.

Methoprene, fenoksikarb ve pyriproxyfen gibi juvenil hormon analoglarının böcek büyüme faktörleri olarak etkinlikleri kanıtlanmıştır (Fujimoto et. al., 2013). Buna bağlı olarak juvenil hormonun böcek gelişimini düzenlemede oynadığı rolün anlaşılmasında, juvenil hormonun etkilerini taklit eden juvenil hormon analoglarının (JHA) geliştirilmesi oldukça etkili olmuştur (Dedos et al., 2002; Wilson, 2004).

Juvenil hormon böceklerin larval gelişimi üzerinde oldukça etkilidir. Juvenil hormon analogları son larval evrelerde uygulandıklarında larval özelliklerin korunmasına neden olur. İpek böceği *Bombyx mori*'de larval-larval deri değişimleri sırasında hemolenfte juvenil hormon düzeyi yüksektir. 5. larval evrenin 3. gününden itibaren ise hemolenfte JH düzeyi düşmeye başlarken protorasik bez aktivitesi artmaya dolayısıyla hemolenfte 20E düzeyi yükselmeye başlar (Plantevin et al., 1987). Böylece larva-pupa deri değişiminin gerçekleşmesi sağlanır. Posterior ipek bezi bu dönemde programlanmış hücre ölümü yoluyla dejenere olmaya başlar.

Programlanmış hücre ölümü (PHÖ) çok hücreli ökaryotik organizmalarda istenmeyen, fazlalık olan ya da kanserleşmeye müsait yapıdaki hücrelerin uzaklaştırılması için evrimsel süreçte korunmuş oldukça önemli bir mekanizmadır (Goncu and Parlak, 2008).

PHÖ spesifik genlerin aktivitesine gereksinim duyan ve hücreyi ölüme sürükleyen olaylar zinciridir (Marshall et al., 2009). 3 tip fizyolojik hücre ölümü tipi vardır; apoptotik hücre ölümü (tip I), otofajik hücre ölümü (tip II) ve lizozomal olmayan hücre ölümü (tip III) (Gozuacik and Kimchi, 2004). Apoptoz, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve sonunda hücrenin “apoptotik cisim” adı verilen parçacıklara ayrılması özellikleriyle ayırt edilmektedir (Clarke, 1990). Hücre apoptotik cisimlere ayrıldıktan sonra komşu hücreler tarafından sindirilir. Otofajik hücre ölümünün karakteristikleri ise apoptozisden farklılık gösterebilir. Morfolojik olarak en belirgin özelliği hücre içerisinde çok sayıda otofajik vakuolün birikmesidir.

Otofajik hücre ölümü fizyolojik stres altındayken hücre içi molekülerin geri dönüşümünü sağlayarak gerekli besinlerin temin edilmesinde iş görür (Göncü and Parlak., 2008). Bununla birlikte son yapılan çalışmalar otofajinin metabolizmanın düzenlenmesi, hücre farklılaşması, morfogeneze, yaşlanma ve hücre için patojenlerin yıkımında önemli roller üstelendiğini göstermiştir (Öz vd., 2011).

Otofaji çok sayıda vakuolün oluşması ile karakterize edilir. Apoptozun aksine kaspaz bağımsız bir hücre ölümü tipidir ve DNA fragmentasyonu gerçekleşmez. Tip II lizozomal bir hücre ölümü tipidir ve inflamasyona sebep olmaz (Lockshin and Zakeri, 2004). Otofajik hücre ölümünün bir diğer biyokimyasal işareti de lizozomal enzim aktivitelerinde artış meydana gelmesidir (Sass et. al., 1989; Zakeri et al., 1996).

Çalışmada ipek böceği *Bombyx mori* posterior ipek bezindeki programlanmış hücre ölümü sürecinde endokrin sistemin rolü araştırılmıştır. Bu amaçla histolojik teknikler kullanılarak larval-pupal dönemde posterior ipek bezindeki morfolojik değişimler gösterilmiştir. Bununla birlikte SDS-PAGE yöntemi ile ipek bezindeki total protein profili ortaya konulmuş; posterior ipek bezinde lizozomal bir enzim olan asit fosfataz aktivitesi araştırılmıştır.

2. MATEYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Deney hayvanları

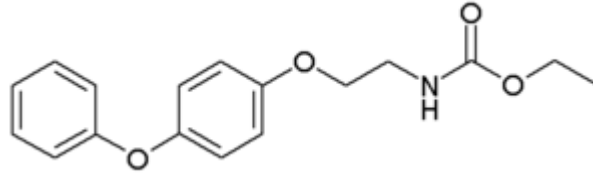
Bu araştırmada deney hayvanı olarak ipek böceği *Bombyx mori* kullanılmıştır. Bursa Kozabirlikten temin edilen Japon X Çin hibriti beyaz monovoltin ırk ipekböceği yumurtaları 8-10 günlük bir inkübasyonun ardından ipek böceği kültür laboratuvarında beslenmeye alınmıştır.

2.1.2. Deneyde kullanılan juvenil hormon analogu

Deneyde juvenil hormon analogu olarak fenoksikarb (ethyl[2-(4-phenoxy-phenoxy)-ethyl]carbamate) kullanılmıştır. Fenoksikarb ($C_{17}H_{19}NO_4$) ilk kez 1981 yılında keşfedilmiş ve 1987’de İngiltere Ürün Koruma Konseyinden R. Maag AG tarafından tanıtılmıştır. Fenoksikarb nörotoksik olmayan geniş spektrumlu böcek büyüme faktörüdür ve tarım zararlılarının kontrolünde kullanılır.

Fenoksikarb

Kimyasal Formülü:



Kimyasal adı:

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

Fiziko-kimyasal özellikleri:

Molekül Formülü: $C_{17}H_{19}NO_4$

Molekül Ağırlığı: 301,30 g/mol

Suda çözünürlüğü: 6 mg/L, 20°C’de

Erime noktası: 53-54 °C

Çevresel ömrü:

Hidrolizle yarı ömrü: 3136 gün (pH:7)

Suda fotoliziz: 18-23 gün primer

Toprakta fotoliziz: 6-14 gün primer

73-1351 gün sekonder

Alanda dağılma yarı ömrü: 3-5 gün primer

13-14 gün sekunder

Aerobik suda yarı ömrü: 19 gün

Aerobik toprakta yarı ömrü: 254 gün

Anaerobik toprakta yarı ömrü: 113 gün

2.2. Metod

2.2.1. İpek böceklerinin yetiştirilmesi

İpek böceği laboratuvarında böceklerin sağlıklı yetişmesi için gerekli laboratuvar bakımı yapıp, nem %70-75 seviyelerine, sıcaklık 25 ± 1 °C'ye getirilerek optimal koşullar sağlanmıştır. Yumurtaların 10 günlük inkübasyonu sonrası çıkan larvalar günde 3 kere aynı saatte olmak üzere taze dut yapraklarıyla beslenmiştir. 21 gün sonra 5. larval evreye geçen böcekler kontrol ve uygulama grubu olarak ikiye ayrılmıştır. Her grup 100'er hayvandan oluşturulmuştur.

2.2.2. Fenoksikarb uygulaması

Juvenil hormon analogu fenoksikarb 1 ng/10 µl konsantrasyonunda asetonda çözündürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan solusyon kullanılıncaya kadar -20 °C' de saklanmıştır. Fenoksikarb uygulaması 5. larval evrenin 0. gününde,

fotofaz başlangıcında, hayvanlar beslenmeden önce yapılmıştır. İşlem hayvanın dorsal-median hattında yüzeye uygulama şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.3. Posterior ipek bezlerinin alınması

Kontrol ve uygulama gruplarının 7. gününden itibaren her gün saat 10.00'da ipek bezleri alınmaya başlanmıştır. Hayvan ventral hattı boyunca açılarak ipek bezlerinin toplanması sağlanmıştır. Toplanan materyal lepidopter fosfat tuz (LPS) solüsyonu ile yıkanmıştır.

Alınan materyalin bir kısmı histolojik incelemeler için fikse edildikten sonra alkolde, diğer bir kısmı ise biyokimyasal analizler için -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

LPS (lepidopteran phosphate saline) solüsyonu hazırlanışı

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

- Kimyasallar hassas terazide tartıldıktan sonra üzeri 500 ml su ile tamamlanıp, solüsyonun pH'ı 6.5'e ayarlanmıştır.

2.2.4. Histolojik incelemeler

Histolojik inceleme için uygulama ve kontrol grubundan 3'er tane olmak üzere toplam 6 hayvan disekte edilmiştir. Alınan örnekler Bouin reaktifi ile 24 saat muamele edilerek fiske edilmiştir. Örnekler daha sonra %70 alkol ile yıkanmıştır.

Bouin solüsyonu:

Bouin solüsyonu ışık mikroskobu ile yapılacak histolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir fiksatifdir. Çözelti satüre pikrik asit, formaldehit ve

asetik asit ile hazırlanır. Bu üç maddenin etkileri birbirlerini çok iyi dengelediğinden keskin bir H&E boyaması sağlar.

Bouin solüsyonunun hazırlanışı

Satüre pikrik asit	150ml
Formaldehit	50ml
Asetik asit	10ml

Gömme işlemi

Fiksatiften kurtarma	%70 alkol	
Dehidrasyon	%80 alkol	2x15 dk
	%96 alkol	2x15 dk
	%100 alkol	2x15 dk
Şeffaflaştırma	%100 alkol-ksilol(1:1)	20 dk
	Ksilol	2x10 dk
Parafinizasyon	ksilol-parafin(1:1)	30 dk
	parafin I	1 sa
	parafin II	2 sa

Yukarıdaki serinin sonunda dokular bloklar halinde parafine gömülmüştür.

Kesit alma

Parafin bloklarda ki örneklerden mikrotom ile 5 mikronluk kesitler alınmıştır.

Boyama işlemi

Deparafinizasyon	Ksilol	2x15 dk
Hidratasyon	%100 alkol	2x15 dk
	%96 alkol	2x15 dk
	%80 alkol	2x15 dk
	%70 alkol	2x15 dk
Boyama ₁	Hematoksilen	2 dk
Yıkama	Akarsu	4 dk
	Saf su	30 sn
Diferansiasyon	Asit-alkol	3 sn
Boyama ₂	Eozin	5 dk
Yıkama	Akarsu	4 dk
	Saf su	30 sn
Dehidratasyon	%70 alkol	2 dk
	%80 alkol	2x5 dk
	%96 alkol	2x5 dk
	%100 alkol	2x5 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol	2x15 dk
Kapatma	Entallen	

Asit alkol hazırlanışı

%70 alkol içinde %1 oranında HCl çözeltisi hazırlanır.

Gill's hematoksilen hazırlanışı

Hematoksilen	6 gr
Alüminyum sülfat	80 gr
Asetik asit	20 ml
Sodyum iodat	0,6 gr
Etilen glikol	250 ml
Distile su	750 ml

Karışım olgunlaşması için 15- 30 gün inkübasyona bırakılır.

2.2.5. Total protein miktarları tayini

Total protein tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Standart olarak 2 mg/ml stok olan sığır serum albumininden (BSA, Pierce) 30 µl'de 20 µg, 15 µg, 10 µg ve 0 µg protein olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. 30 µg örneklerin ve standartların her birine 900µl Bradford reaktifi eklenerek polistren küvetlere konulmuş ve 595 nm dalga boyunda Agilent Technology Cary 60 UV Vis marka spektrofotometre sisteminde okutulmuştur. Standart grafikleri çizilip, örneklerin her birinin total protein miktarları hesaplanmıştır.

Bradford Reaktifinin Hazırlanışı:

Comassie brilliant blue G250 (0,1 g) %95 etanolde (50 ml) çözündürülmüştür. Üzerine %85 fosforik asit (100ml) eklenip manyetik karıştırıcıda tortu kalmayınca kadar karıştırılıp distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Filtre kağıdı ile süzülüp +4°C'de koyu bir şişede saklanmıştır.

2.2.6. Asit fosfataz enzim aktivitesi incelemeleri

-80 °C’de saklanan dokular 37 °C’de çözdürülmüş ve 1000 µl, %0,9 oranında NaCl çözeltisi eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenatlar 8000 G’de 10 dk santrifüjlenmiştir.

Standartların belirlenmesi için 0,00139 gr p_nitrofenol 10 ml sitrat tamponunda çözdürülür. Elde edilen çözeltiden 10µl/10nmol, 20µl/20nmol, 40µl/40nmol, 60µl/60nmol, 80µl/80nmol, 100µl/100nmol substrat olacak şekilde ayarlandıktan sonra NaOH ile 1,4 ml’ye tamamlanır. Asit fosfataz enzimi aktivitesinin belirlenmesi için, 100 µl sitrat tamponu, 100 µl p_nitrofenil fosfat solüsyonu ve 200 µl homojenat 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Bu reaksiyon 0.1 N NaOH ilavesiyle durdurulmuştur. Elde edilen standartlar ve örnekler polistren küvetlerde Agilent Technology Cary 60 UV Vis spektrofotometre sistemi ile 405 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Sitrat tamponu: (90 mM pH:4.8)

Sitrik asit	7,89 gr/lt
Sodyum sitrat	15,4 gr/lt

p_nitrofenil fosfat solusyonu:

p_nitrofenol fosfat	0,0027 gr
Sitrat tamponu	20 ml

0,1 N NaOH solusyonu

NaOH	4 gr
Saf su	1 lt

2.2.7. Elektroforez

Elektroforetik işlemler Laemmli (1970)’e göre sürekli olmayan (discontinuous) tampon sistemi kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel

elektroforezi (SDS-PAGE) şeklinde yapılmıştır. Her bir SDS-PAGE için kalınlıkları 1,5 mm olan ve monomer oranı %4' lük (0,125 M tris, pH 6,8), yükleme (staging) jeli, %10 (0,375 M tris, pH 8,8)'lik yürütme (sperating) jeli hazırlanmıştır. Örneklere hacimce 1:1 4 oranında 2X örnek tamponu eklenip 5 dakika 95°C'de denatüre edilmiştir. Her bir kuyucuk içim 4 µg total protein yüklenmiştir. Yürütme işlemi Bio-Rad Protean II xi Cell elektroforez cihazında yükleme jelinde +4 °C'de 25mA'de 1 ve yürütme jelinde +4 °C'de 35mA'de 4 saat olmak üzere toplam 5 saatte yapılmıştır. Güç kaynağı olarak Bio-Rad Powerpac Universal cihazı, marker olarak Biorad Precision Plus Protein Standard (15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 ve 250 kD) kullanılmıştır. Jeller gümüş boyama prosedürü kullanılarak boyanmış ve BIO-RAD ChemiDOC MP jel görüntüleme sisteminde fotoğrafları çekilmiştir. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi ve bant yoğunluklarının hesaplanması için Image Lab programı kullanılmıştır.

Stok Solüsyonların Hazırlanışı

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

Sigma Akrilamid (29,2 g) ve Sigma N,N'-Metilen-bis Akrilamid (0,8 g) ultrapür su ile çözdürülüp 100 ml tamamlanmış ve koyu şişelerde +4 °C'de saklanmıştır.

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Sigma Tris'e (18,15 g) 50 ml ultrapür su eklenip pH 8,8'e HCl ile ayarlanmış ve ultrapür su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Solüsyon koyu şişelerde +4°C'de saklanmıştır.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Sigma Tris'e (3 g) 30 ml ultrapür su ile eklenip pH 6,8'e HCl ile ayarlanmış ve ultrapür su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Solüsyon koyu şişelerde +4°C'de saklanmıştır.

%10 (ağırlık/hacim)(W/V) SDS (sodyum dodesil sülfat)

Sigma SDS (10 g) ultrapür su ile 100 ml tamamlanmış ve hafifçe karıştırılmıştır.

%10 (ağırlık/hacim)(W/V) APS (amonyum persülfat)

Sigma APS (100 mg) 1 ml ultrapür suda çözündürülmüştür. %10 APS jelin döküldüğü gün taze olarak hazırlanmıştır.

2X Örnek tamponu (indirgeyici tampon olarak SDS, 62,5 mM tris-HCl pH6,8, %20 gliserol, %2 SDS, %5 β -merkaptotanol)

Ultrapür su (3 ml), 0,5 M tris-HCl pH 6,8 (1 ml), gliserol (1,6 ml), %10 SDS (1,6 ml), Sigma β -merkaptotanol (0,4 ml), %0,5 (ağırlık/hacim) suda bromfenol mavisi belirtilen miktarlarda karıştırılmış ve eppendorf tüplerine konularak -20 ° C’de saklanmıştır.

5X Elektrod (yürütme) tamponu (1X= 25mM tris, 192mM glisin,% 0,1 SDS, pH 8,3)

Tris (22,5 g), Sigma glisin (108 g) ve SDS (7,5 g) 1,5 L distile su ile tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

%10 yürütücü jelin hazırlanması (50 ml):

Stok Akrilamid/Bis (%30T, %2.67C) 16,65 ml, ultrapür su 20,1 ml, stok 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 12.5 ml, stok %10 (ağırlık/hacim) SDS (sodyum dodesil sülfat) 500 μ l, taze %10 (ağırlık/hacim) APS (amonyum persülfat) 250 μ l beher içinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılıp polimerleşmenin gerçekleştirmesi için N-NN’N’-tetrametiletilen-diamin (TEMED) (BDH Laboratory Reagents) 25 μ l eklenmiş bir süre daha karıştırılarak enjektörler yardımı ile sızdırmaz cam tabakalar içine dökülmüştür. 2 saat polimerleşmeye bırakılmıştır.

% 4 yükleme jelinin hazırlanması (10 ml):

Stok Akrilamid/Bis (%30T, %2.67C) 1,3 ml, ultrapür su 6,1 ml, stok 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 2,5 ml, stok %10 (ağırlık/hacim) SDS 100 μ l, taze %10 (ağırlık/hacim) APS 50 μ l beher içinde manyetik karıştırıcı ile hava kabarcığı oluşturulmadan karıştırılmıştır. Polimerleşmeyi gerçekleştirmesi için N-NN’N’-

tetrametiletilen- diamin 10 µl eklenmiş bir süre daha karıştırılarak enjektörler yardımı ile polimerleşmiş yürütücü jelin üzerine dökülmüştür.

Gümüş boyama

1. Fix tamponda jel (%50 methanol, %5 asetik asit) 20 dakika fikse edilmiştir.
2. Yıkama solüsyonu (%50 metil alkol) ile jel 10 dakika çalkalayıcı üzerinde hafifçe salınım ile yıkanmıştır.
3. Jel gece boyu distile su ile yıkanmıştır.
4. Jel 1 dakika ön muamele solüsyonu (%0,02 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ile birlikte hafifçe çalkalanmıştır.
5. 2 defa 30'ar saniye distile su ile yıkanmıştır
6. 3 defa distile su ile 20 saniye çalkalanmıştır.
7. Sonra boyama solüsyonu (%0,1 AgNO_3) ile 20 dakika çalkalayıcı üzerinde boyamaya bırakılmıştır.
8. 2 defa 1'er dakika distile su ile yıkanmıştır.
9. Yıkama sonrası jel, geliştirme solüsyonu (%2 Na_2CO_3 , %0,04 formalin) ile bantlar iyi bir şekilde görünür hale gelene kadar geliştirilmiştir (yaklaşık 10 dakika).
10. Jeller durdurma solüsyonunda (%5 asetik asit) 10 dakika çalkalanmıştır.
11. Durdurma işlemi sonrası saklama için jel %50 metanole alınmıştır.

3.BULGULAR

Araştırmamız bir kontrol ve bir uygulama olmak üzere iki grup böcek üzerinde yapılmıştır.

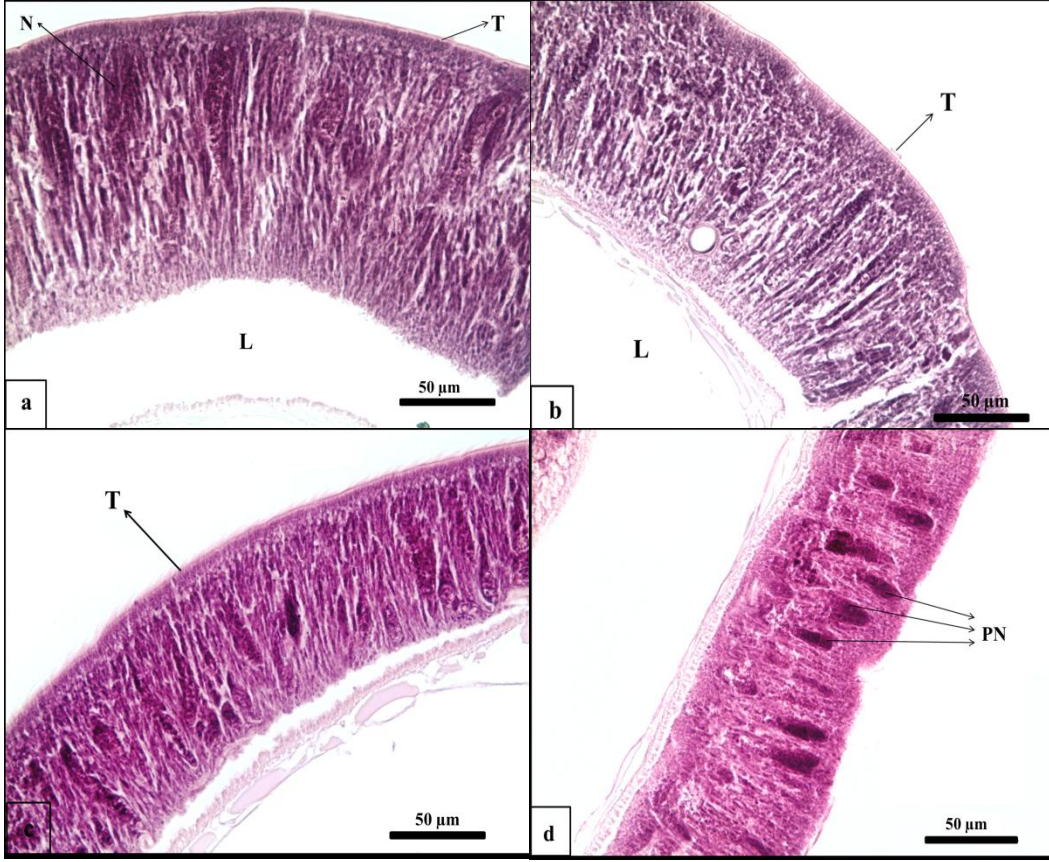
Kontrol grubu böcekler 5. larval dönemin 7. günü gut purge (bağırsak içeriğinin boşaltılması) olayını gerçekleştirdikten sonra örme davranışı göstermeye başlamışlardır. Son larval evre 10. gününün sonunda ise pupalaşma gerçekleşmiştir. Çalışmamızda bu gruptaki böceklerin larval dönemde; 7., 8., 9., ve 10. günleri ile pupal dönemde 0., 12., 24., ve 36., saatleri incelenmiştir.

Uygulama grubu böceklere 5. larval dönemin 0. günü fenoksikarb uygulaması yapılmıştır. Bu böceklerin bir kısmı ölmüş, büyük bir kısmının ise larval dönemi 13. güne kadar uzamıştır. Araştırmamızda bu gruptaki hayvanların incelemeleri larval dönemde 7., 8., 9., 10., 11., 12., ve 13. günler ile pupal dönemde 0., 12., 24., ve 36., saatlerde yapılmıştır.

3.1. Histolojik Bulgular

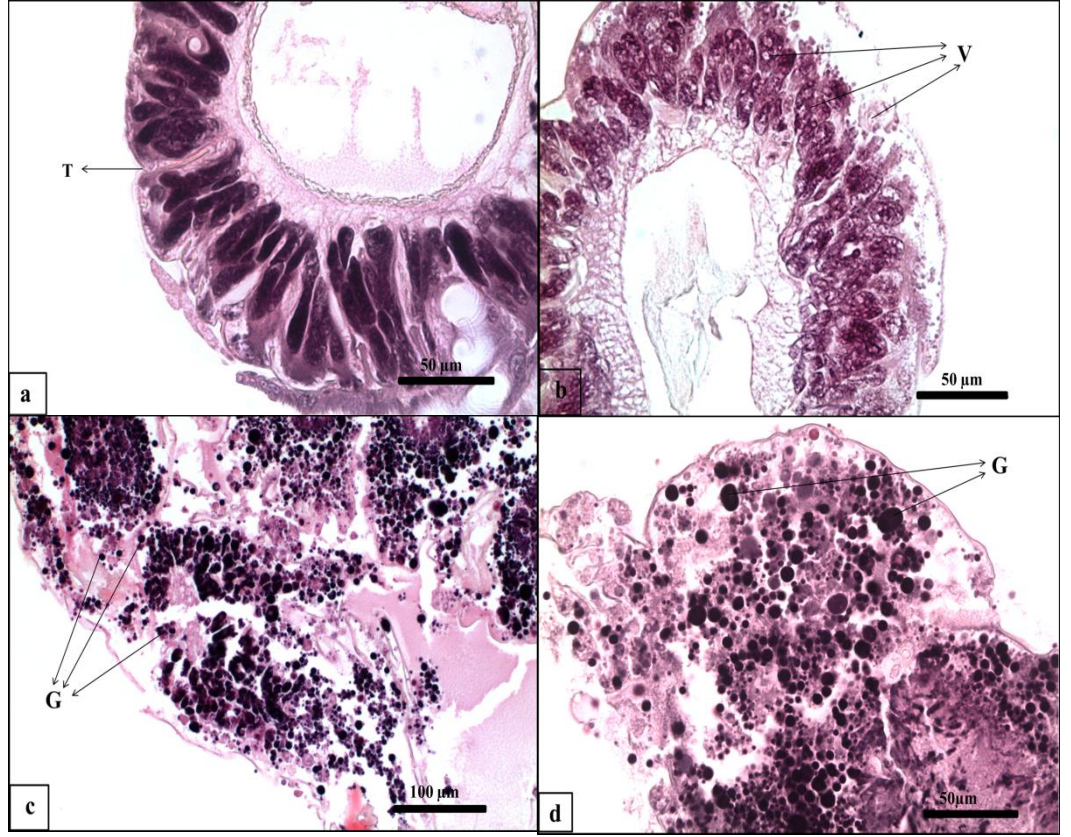
3.1.1. Kontrol grubu

Kontrol grubu örneklerinin ipek bezlerinin posterior kısmından 5. larval evrenin 7. gününden itibaren alınan kesitler hematoksilin-eosin boyası ile boyanmış ve ışık mikroskobu altında incelenmiştir. 7 ve 8. günde en dıştan tunica propria ile çevrili olan ipek bezi hücreleri belirgin bir hat üzerinde sıralanmış ve dallanmış nukleuslarıyla görülmüş, fakat hücre sınırları ayırt edilememiştir. (Şekil 3.1a ve şekil 3.1b). 9 ve 10. günlerde bezin genel yapısı çok değişmese de dallanmış bir yapı gösteren nukleus özellikle 10. günde piknotik bir görünüm almış ve hücreler arası alan belirmeye başlamıştır (Şekil 3.1c ve şekil 3.1d).



Şekil 3.1. Larvada posterior ipek bezinin genel görünümü. Tunica propria (T), lümen (L), nukleus (N), piknotik nukleus (PN). (a: 7. gün, b: 8. gün, c: 9. gün, d: 10. gün)

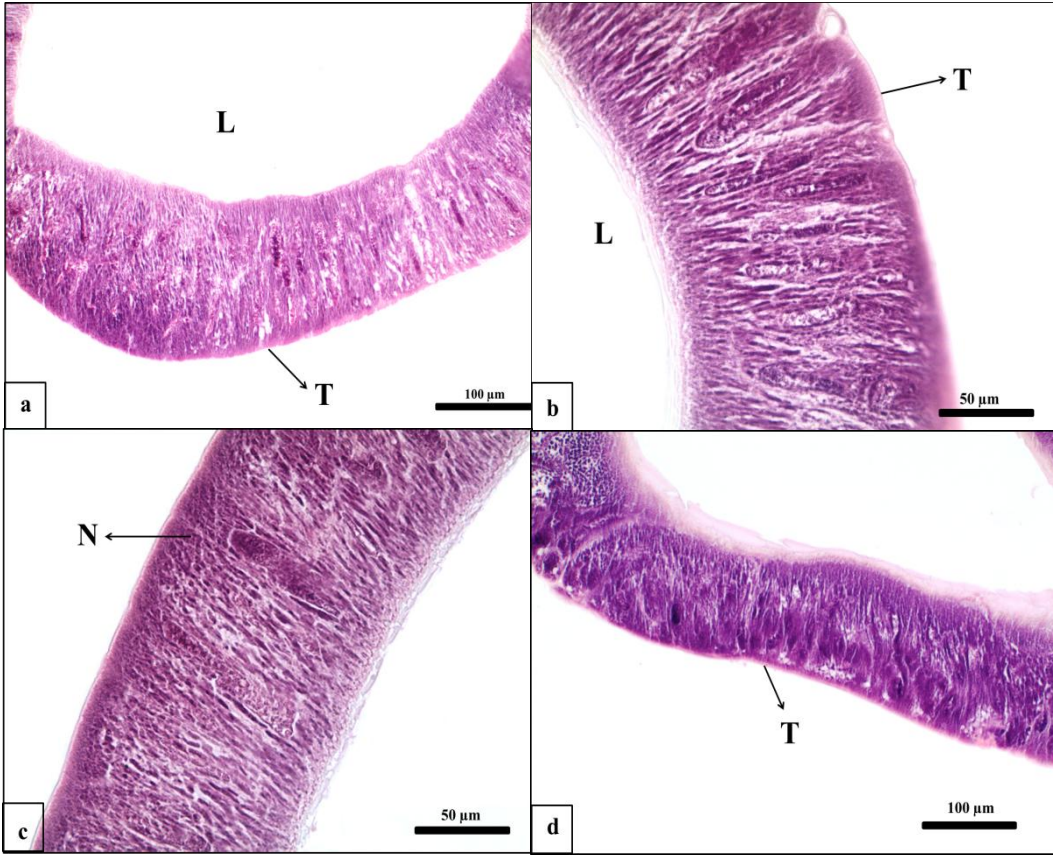
Pupalaşmanın başından itibaren, ipek bezi hücreleri küçülmeye başlamış ve tunica propriada invajinasyon gözlenmiştir (Şekil 3.2a). 12. saatte hücre yapılarında dejenerasyon, nukleusta ilerleyen yoğunlaşma ve hücre içerisinde sayıca fazla otofajik vakuoller görülmüştür (Şekil 3.2b). 24 ve 36. saatte hücre bütünlük tamamen kaybolmuş, doku geneline yayılmış halde kromatin materyali gözlemlenmiştir. Hücre yapıları tamamen bozulmuş ve hücrelerin tek tek ayırt edilemediği ortaya konmuştur (Şekil 3.2c ve şekil 3.2d).



Şekil 3.2. Pupada posterior ipek bezinin genel görünümü. Tunica propria (T), otofajik vakuol (V), kromatinler (G). (a: 0. saat, b: 12. saat, c: 24. saat, d:36. saat)

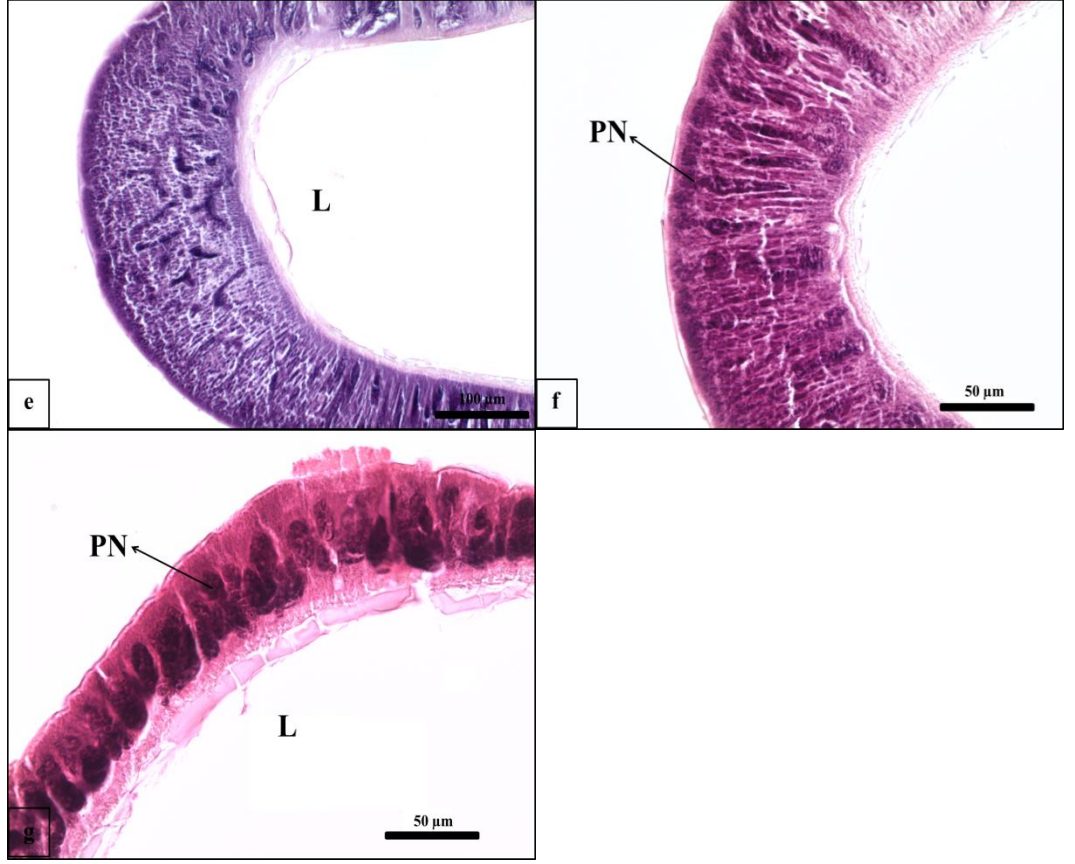
3.1.2. Uygulama grubu

5. larval evrenin 0. gününde 1 ng fenoksikarb uygulanan örneklerin ipek bezlerinin 7, 8 ve 9. günlerin genel görünümünde önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Dıştan tunica propria ile sarılı olan dokuda hücreler dallanmış nükleuslarıyla görülmüştür (Şekil 3.3a, 3.3b, 3.3c). 10. günde hücre sınırları hala ayırt edilememekle birlikte piknotik görünümlü nükleusların varlığı belirlenmiştir (Şekil 3.3d).



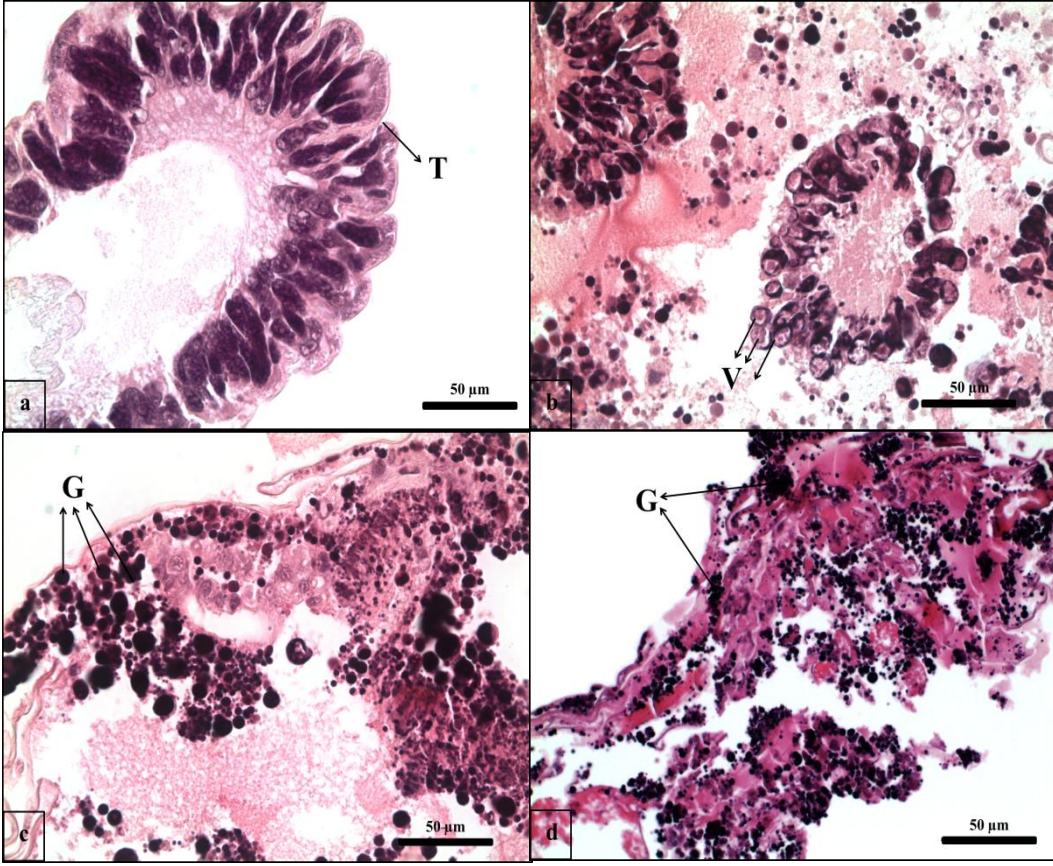
Şekil 3.3. Uygulama grubu örneklerinde posterior ipek bezinin genel görünümü. Tunica propria (T), lümen (L), nukleus (N). (a: 7. gün, b: 8. gün, c: 9. gün, d: 10. gün)

11. günden itibaren hücreler arasındaki alan belirginleşmeye başlamıştır (Şekil 3.4e). 12 ve 13. günlerde hücreler iyice küçülmüş, hücre içerikleri küçülmeden dolayı yoğunlaşmış ve nukleuslardaki piknotik görünüm iyice belirginleşmiştir (Şekil 3.4f ve şekil 3.4g).



Şekil 3.4. Uygulama grubu örneklerinde posterior ipek bezinin genel görünümü. Lümen (L), piknotik nukleus (PN). (e: 11. gün, f: 12. gün, g: 13. gün.)

Pupal evrenin başlangıcında artık hücreler iyice küçülmüştür ve tunica propriada invajinasyon gözlemlenmiştir (Şekil 3.5a). Pupanın 12. saatinde ise pek çok otofajik vakuolün varlığı dikkat çekmiştir (Şekil 3.5b). Pupanın 24 ve 36. saatlerinde artık hücresel yapıların korunduğundan söz etmek mümkün olmamaktadır. Bezin yapısı tamamen değişmiş, dejenere olmuş ve çok sayıda kromatin materyali dokunun geneline yayılmıştır (Şekil 3.5c ve şekil 3.5d).

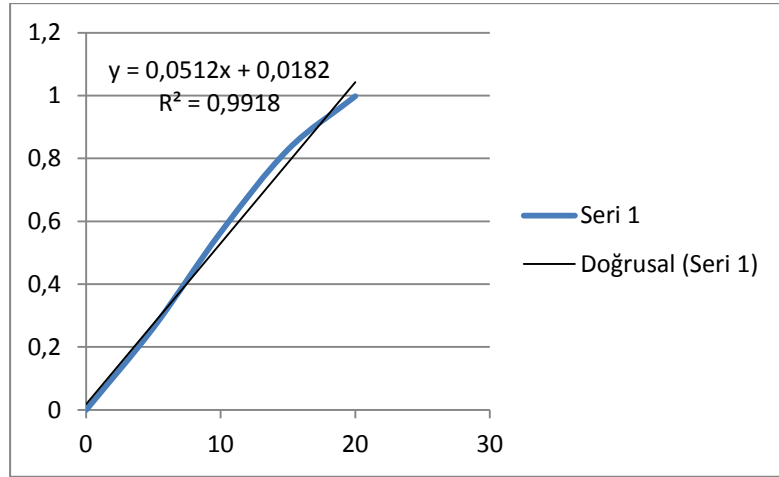


Şekil 3.5. Uygulama grubu pupada posterior ipek bezinin genel görünümü. Tunica propria (T), otofajik vakuol (V), kromatinler (G). (a: 0. saat, b: 12. saat, c: 24. saat, d:36. saat)

3.2. Total Protein Tayini Bulguları

Tablo 1. Total proteini tayini standart grafiği verileri

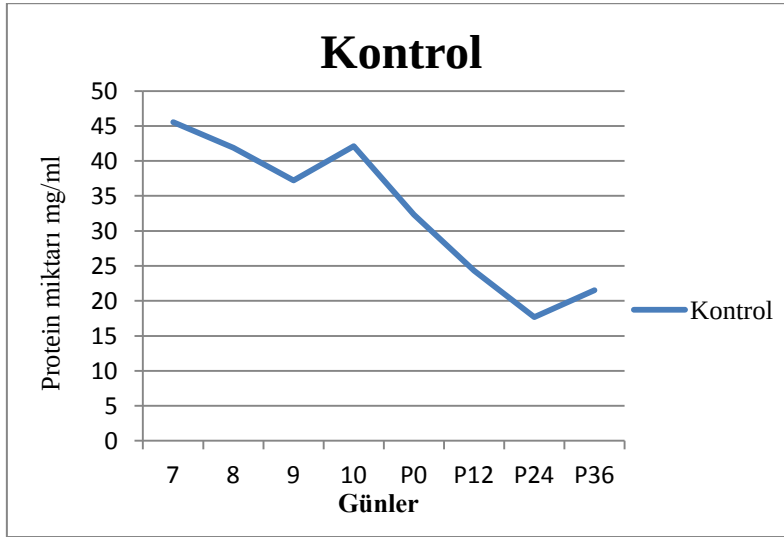
S1	0
S2	0,2618
S3	0,5653
S4	0,82825
S5	0,99785



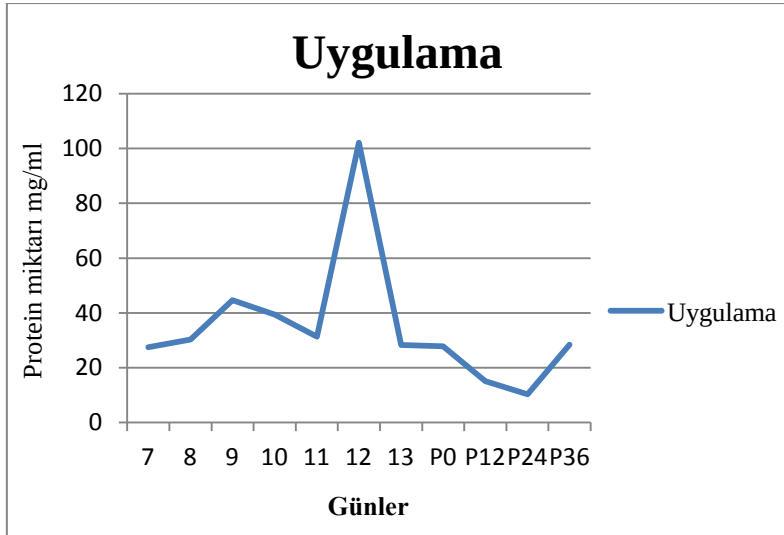
Şekil 3.6. Total protein tayini standart grafiği

Tablo 2. Total protein tayini bulguları(mg cinsinden)

K7	45,53428	0.1.7	27,50522
K8	41,88438	0.1.8	30,28913
K9	37,22123	0.1.9	44,62391
K10	42,09224	0.1.10	39,42406
PO	32,34133	0.1.11	31,31458
P12	24,30156	-	-
P24	17,69613	0.1.12	102,1461
P36	21,51832	-	-
-		0.1.13	28,27691
-		0.1.P0	27,81765
-		0.1.P12	15,13214
-		0.1.P24	10,32304
-		0.1.P36	28,40004



Şekil 3.7. Kontrol grubundaki total protein tayini grafiği



Şekil 3.8. Uygulama grubundaki total protein tayini grafiği

Yapılan çalışmalarda pupalaşmanın hemen öncesinde kontrol ve uygulama gruplarında total protein miktarının arttığı gözlemlenmiştir. Pupaya geçiş ile birlikte protein miktarları azalmıştır. Her iki grupta da pupanın 36. saatinde protein miktarlarının çok az da olsa arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).

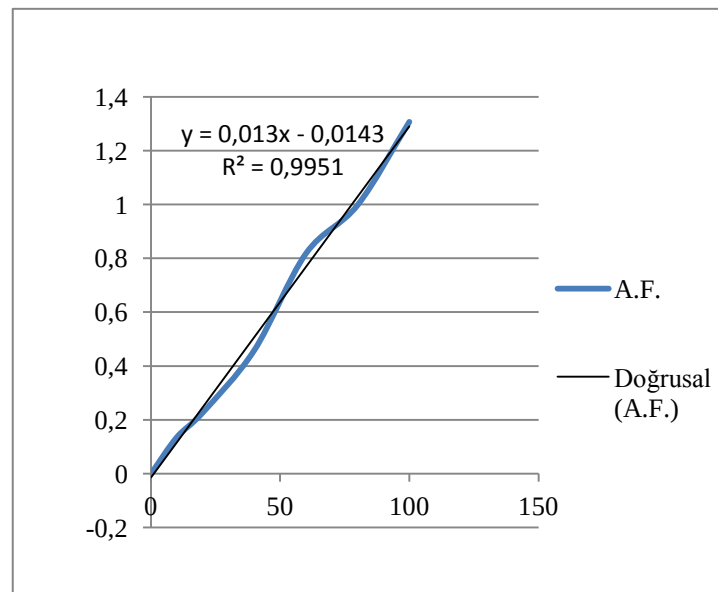
3.3.Enzim Aktivitesi Bulguları

Lizozomal bir enzim olan asit fosfatazın spesifik enzim aktivitesi, diğer bir deyişle 1 mg proteinde bulunan enzim miktarı unit (IU) cinsinden araştırılmıştır.

İpek böceği *Bombyx mori* posterior ipek bezinde bir otofaji belirteci olan asit fosfataz enziminin aktivitesi, bezin dejenerasyonu ile paralel olarak artış göstermiştir.

Tablo 3. Enzim aktivitesi standart grafiği verileri:

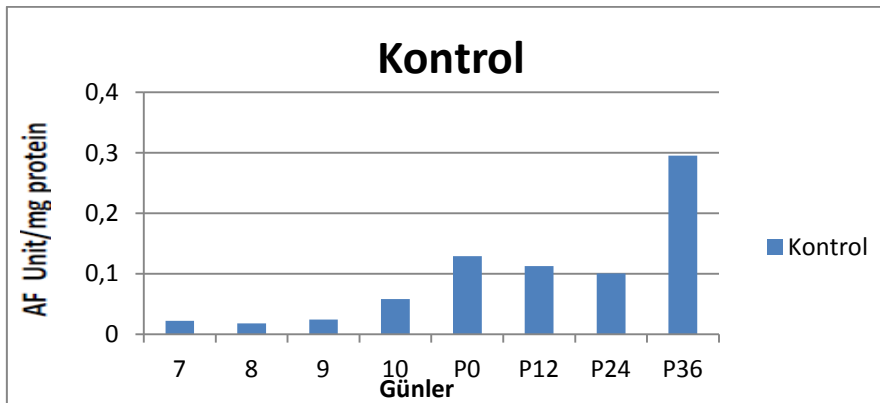
S1	0,135333
S2	0,226767
S3	0,459033
S4	0,818267
S5	0,998333
S6	1,307367



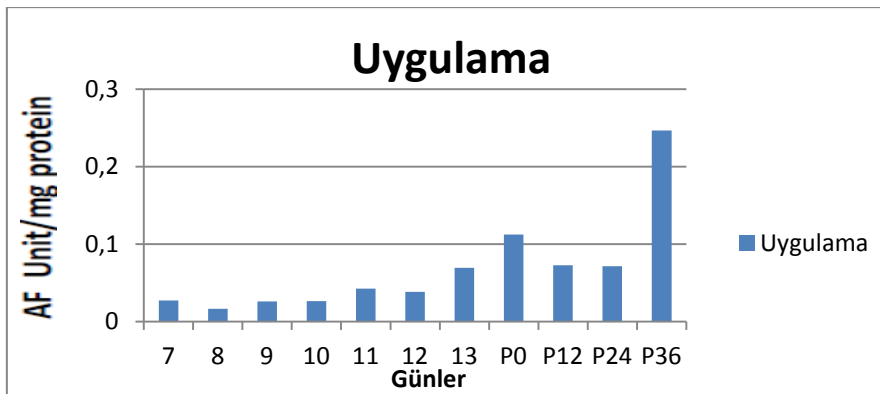
Şekil 3.9 Enzim aktivitesi standart grafiği.

Tablo 4. Enzim aktivitesi bulguları (nmol cinsinden)

K7	0,021918	0.1.7	0,026972
K8	0,017618	0.1.8	0,016212
K9	0,024363	0.1.9	0,025782
K10	0,057899	0.1.10	0,026179
PO	0,129093	0.1.11	0,042286
P12	0,112359	-	-
P24	0,100457	0.1.12	0,038448
P36	0,29537	-	-
-		0.1.13	0,069359
-		0.1.P0	0,112137
-		0.1.P12	0,072529
-		0.1.P24	0,071439
-		0.1.P36	0,246305



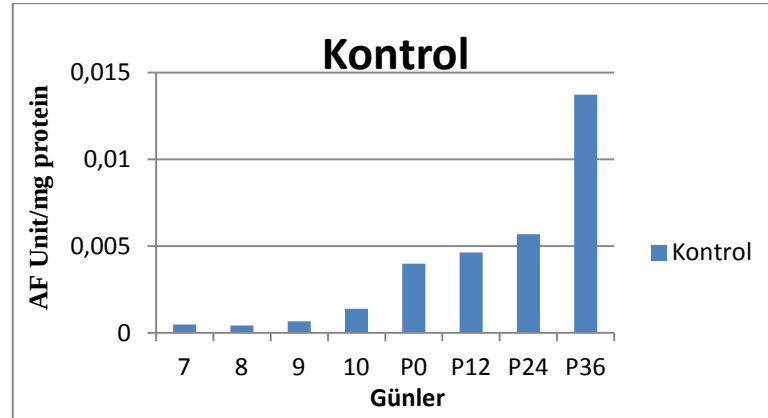
Şekil 3.10. Kontrol grubu enzim aktivitesi bulgular



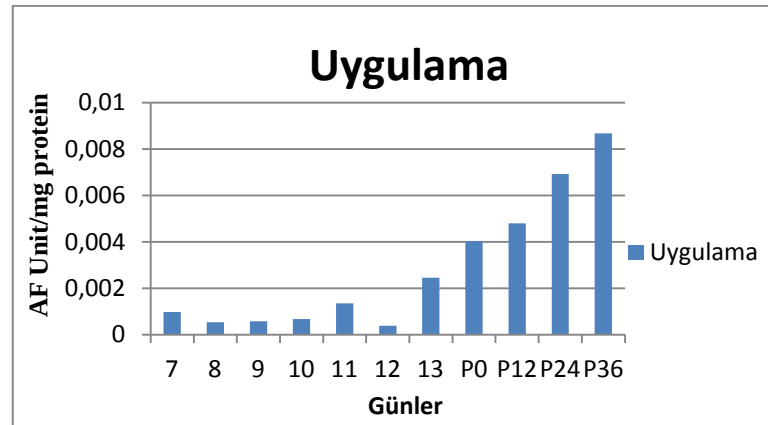
Şekil 3.11. Uygulama grubu enzim aktivitesi bulguları

Tablo 5. Spesifik enzim aktivitesi bulguları (IU cinsinden)

K7	0,000481	0.1.7	0,000981
K8	0,000421	0.1.8	0,000535
K9	0,000655	0.1.9	0,000578
K10	0,001376	0.1.10	0,000664
PO	0,003992	0.1.11	0,00135
P12	0,004624	-	-
P24	0,005677	0.1.12	0,000376
P36	0,013726	-	-
-		0.1.13	0,002453
-		0.1.P0	0,004031
-		0.1.P12	0,004793
-		0.1.P24	0,00692
-		0.1.P36	0,008673



Şekil 3.12. Kontrol grubu spesifik enzim aktivitesi bulguları



Şekil 3.13. Uygulama grubu spesifik enzim aktivitesi bulguları.

Enzim aktivitesi kontrol grubu böceklerde örme davranışının bittiği 10. günden itibaren başlayarak düzenli bir biçimde artmaya devam etmiştir. (Şekil 3.10.)

5. larval evrenin 0. gününde fenoksikarb uygulanan böceklerde ise 13. günden itibaren enzim aktivitesi yükselmiştir. Uygulama grubu böceklerde 12. günde spesifik enzim aktivite grafiğindeki düşüş aynı gün meydana gelen total protein miktarının yükselmesi ile doğrudan ilişkilidir.

Elde edilen bu veriler posterior ipek bezi dejenerasyonunda otofajinin apoptoz ile birlikte iş gördüğünü destekler niteliktedir.

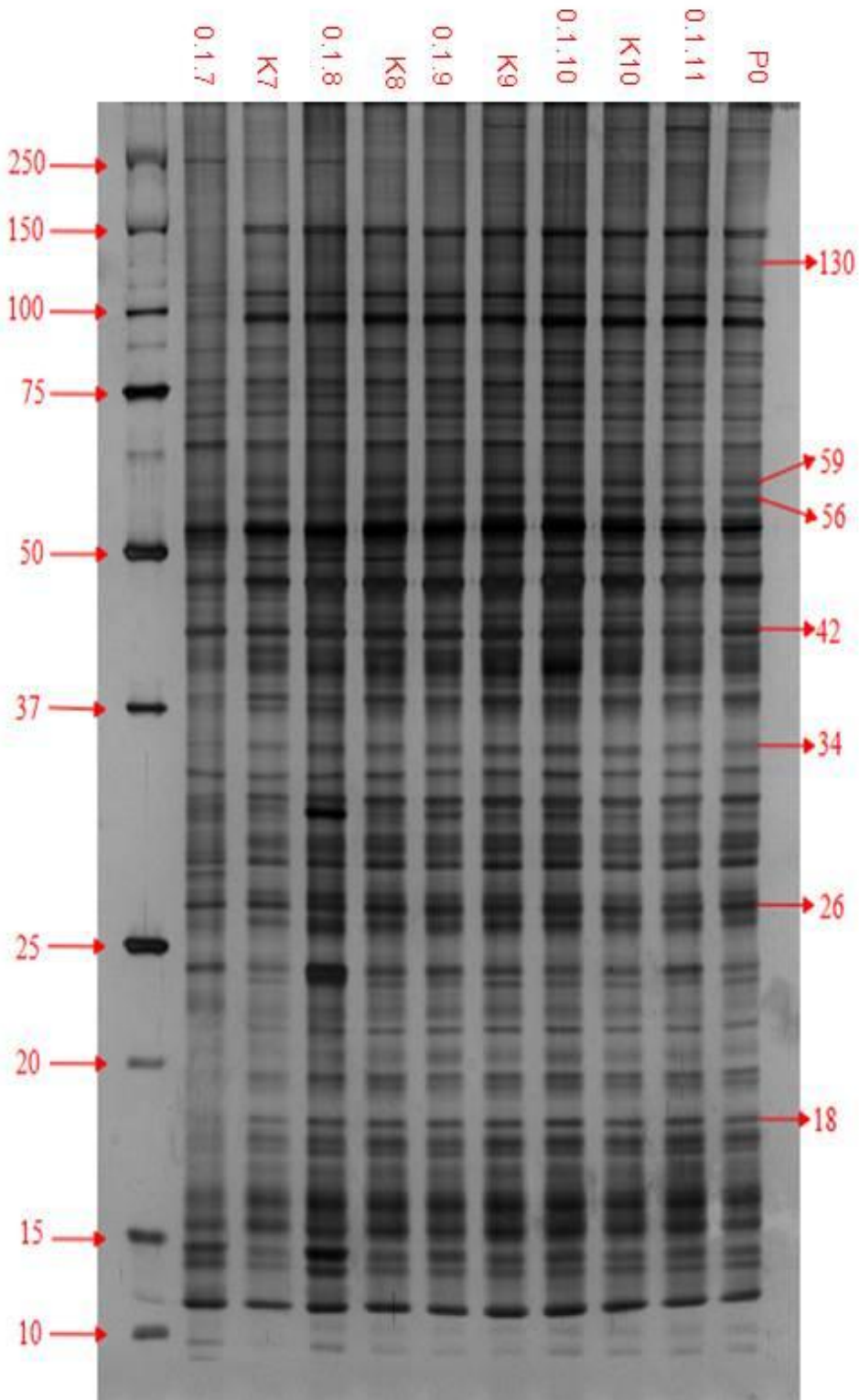
3.4. Elektroforetik Bulgular

Çalışmamızda posterior ipek bezinde larval evrenin son dönemi ile pupal evrenin ilk günlerinde meydana gelen programlanmış hücre ölümünün proteinlere etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma için Bradford yöntemi ile posterior ipek bezindeki total protein miktarları belirlenmiştir. SDS-PAGE gerçekleştirildikten sonra jeller gümüş boyama tekniği ile boyanmıştır. Çalışma sırasında kontrol ve 1 ng uygulama grupları aynı jelde yürütülmüş olup, değerlendirme iki jel ile tamamlanmıştır.

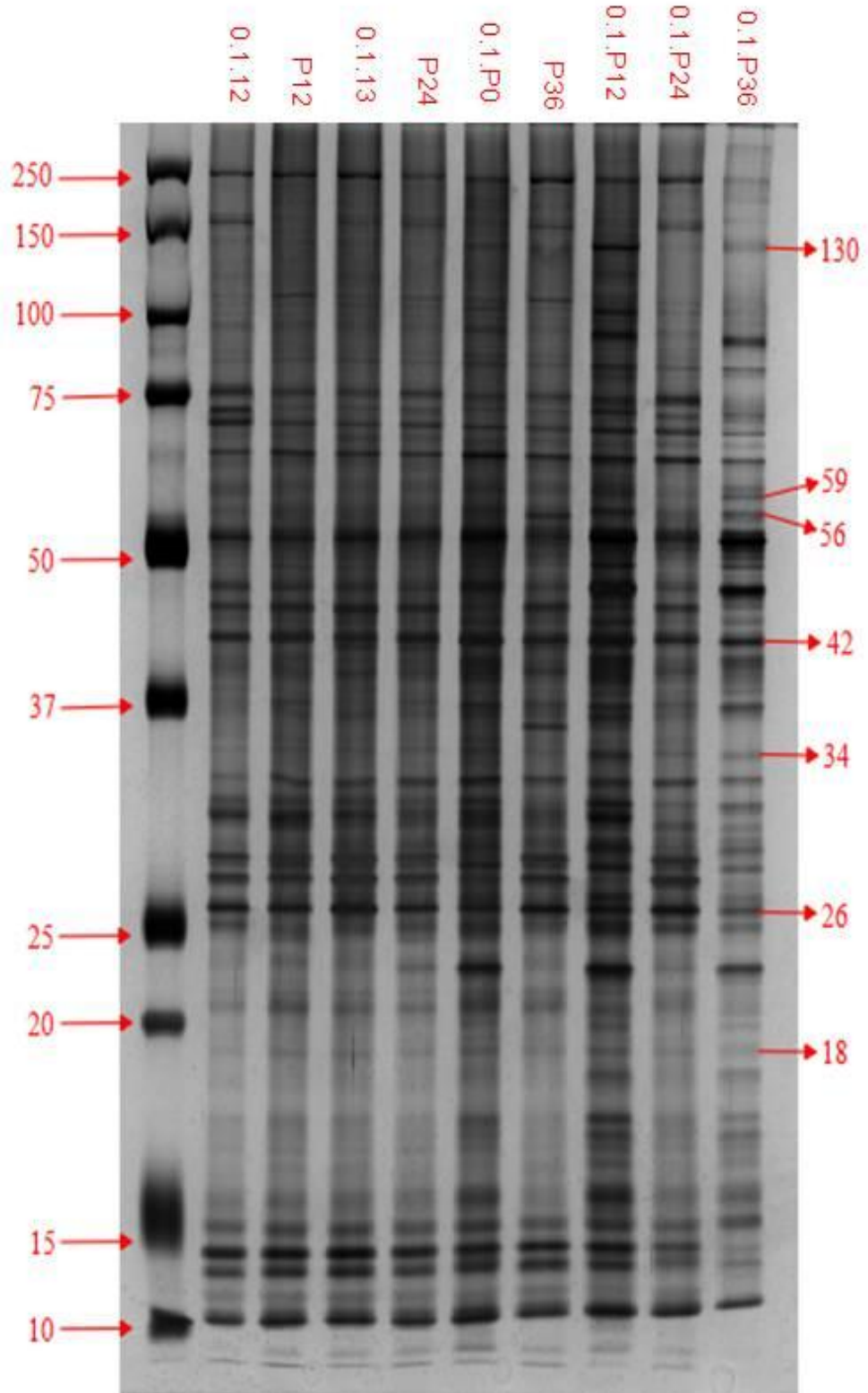
Pupal dönemde ipek bezinin işlevini yitirerek dejenerasyona uğradığı bilinmektedir. Bu dejenerasyonun protein fraksiyonların da değişimlere sebep olduğu gözlemlenmiştir.

15 kDa ağırlığındaki proteinin hem kontrol hem uygulama grubunda pupal dönemin ilk günü yoğunluğunun arttığı ancak uygulama grubunda bu artışın daha yüksek seviyede olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.15). 18 kDa ağırlığında bulunan protein bantlarının dejenerasyonun gerçekleştiği günlerde hem kontrol hem de uygulama grubunda yoğunluklarının azalışı dikkati çekmektedir (Şekil 3.16). 26 kDa ağırlığındaki fibroin proteinin hafif zincirinin bant yoğunluğu incelendiğinde örme davranışı geciken uygulama grubundaki bant yoğunluğunun aynı günlerde örme davranışı gösteren kontrol grubuna göre daha düşük yoğunlukta seyrettiği görülmüştür (Şekil 3.17). 34 kDa ağırlığındaki proteinin dejenerasyonun olduğu dönemlerde yoğunluğu oldukça azalırken, uygulama grubunda, dejenerasyonun son gününde kontrol grubuna göre az seviyede yoğunluk azalışı gözlemlenmiştir (Şekil 3.18). Buna karşın dejenerasyonun gerçekleştiği dönemde, her iki grupta 42

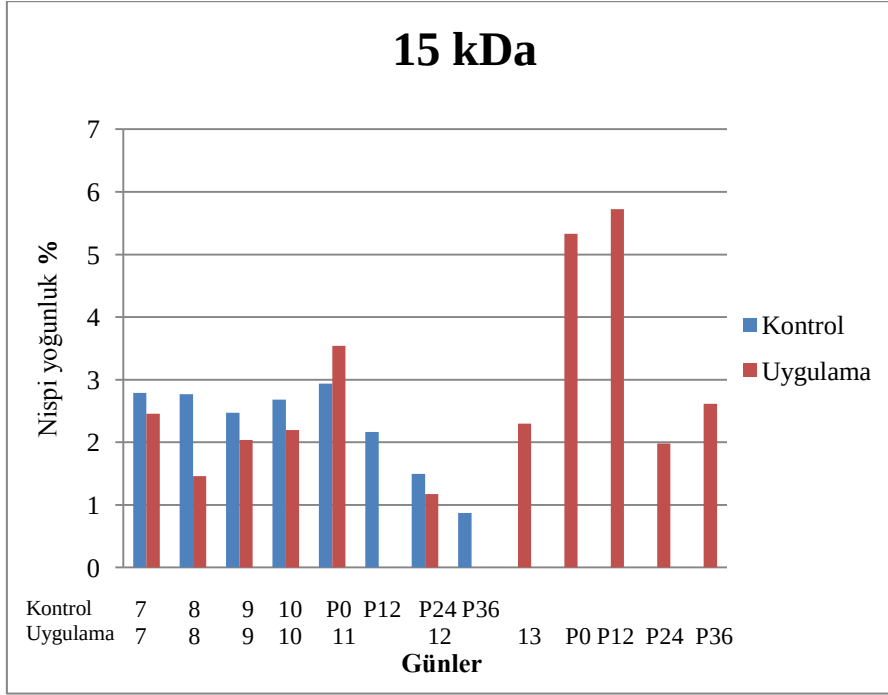
kDa ağırlığındaki protein bandının yoğunluklarının yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 3.19). Bununla birlikte dejenerasyonun gerçekleştiği dönemde 56 kDa (Şekil 3.20) ve 130 kDa (Şekil 3.22) ağırlığında bulunan protein bantlarının kontrol ve uygulama gruplarında yoğunluklarının artması, 59 kDa ağırlığındaki bantlarda ise pupal dönemin ilk günlerinde yoğunlukların azalması dikkati çeken diğer bulgulardır (Şekil 3.21).



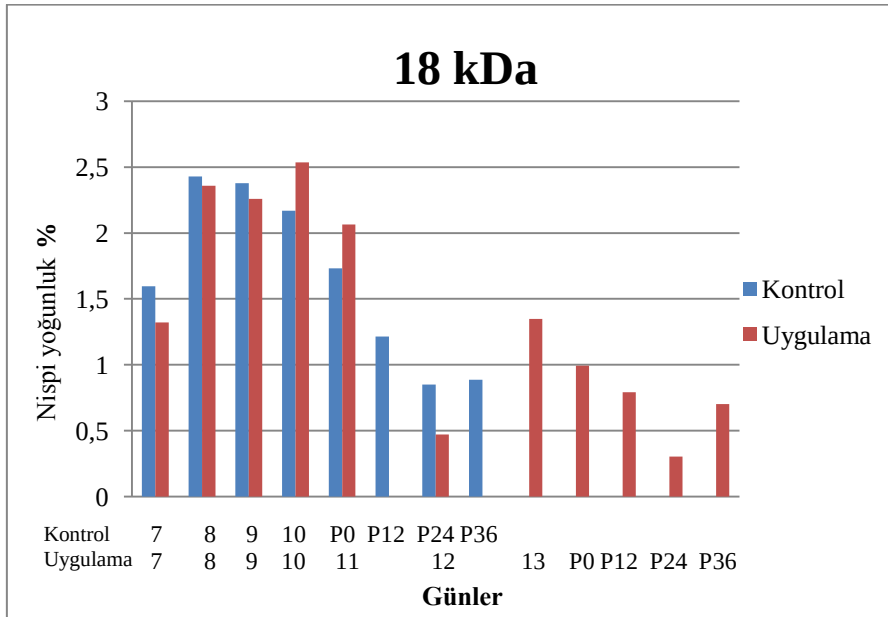
Şekil 3.14a. Posterior ipek bezi protein profilleri



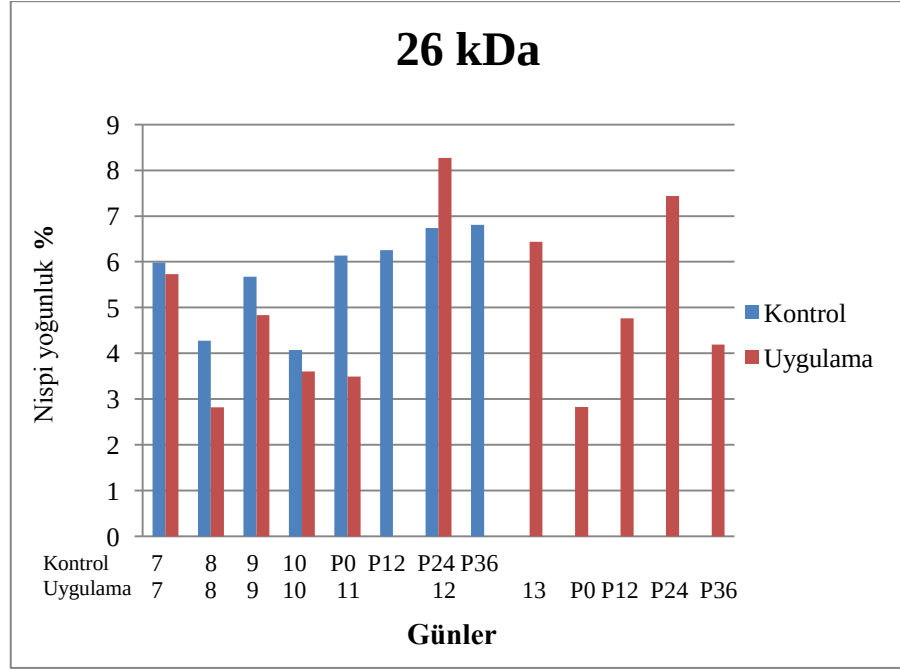
Şekil 3.14b. Posterior ipek bezi protein profilleri



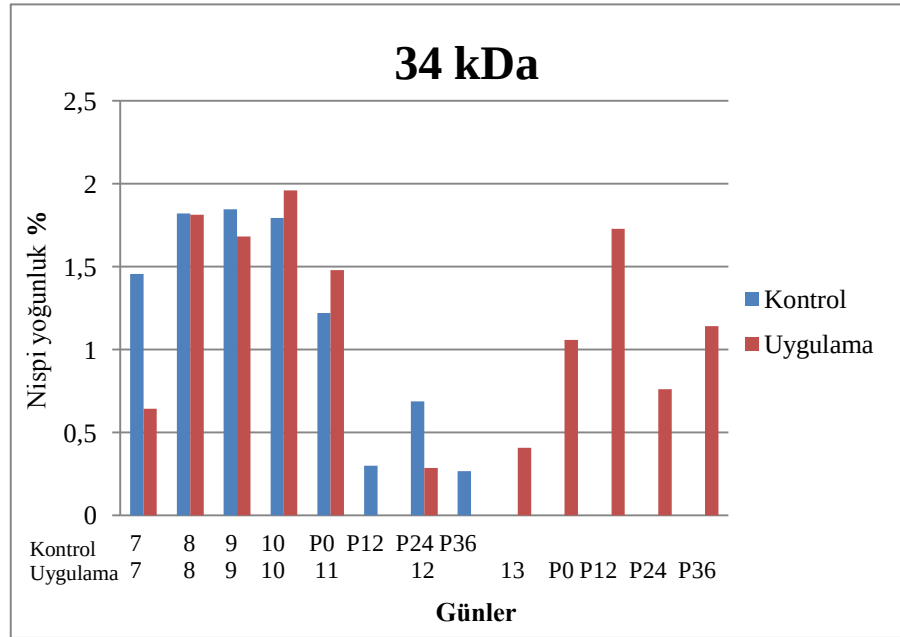
Şekil 3.15. 15 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri.



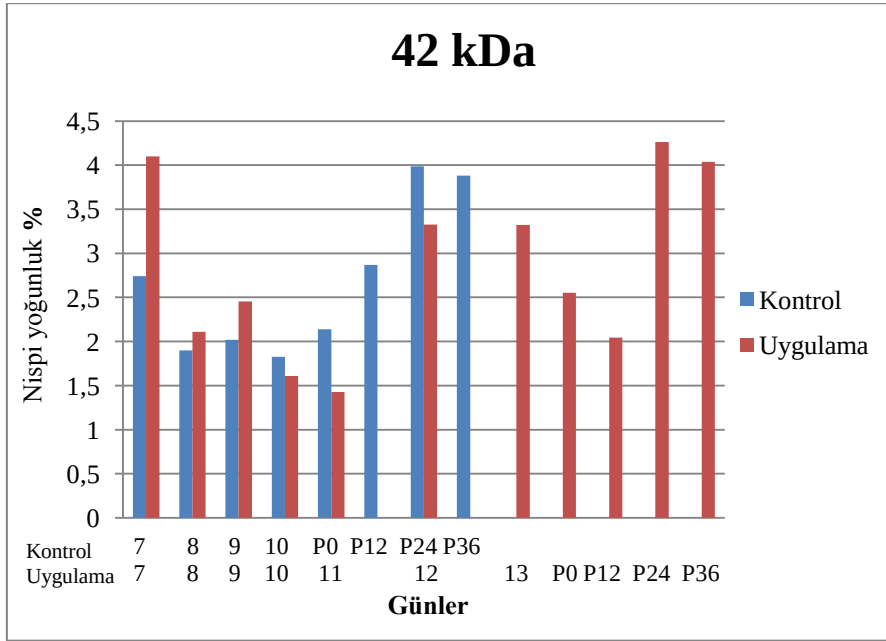
Şekil 3.16. 18 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri. Kontrol ve uygulama grubunda dejenerasyonun başlamasıyla ciddi azalışlar gözlenmektedir.



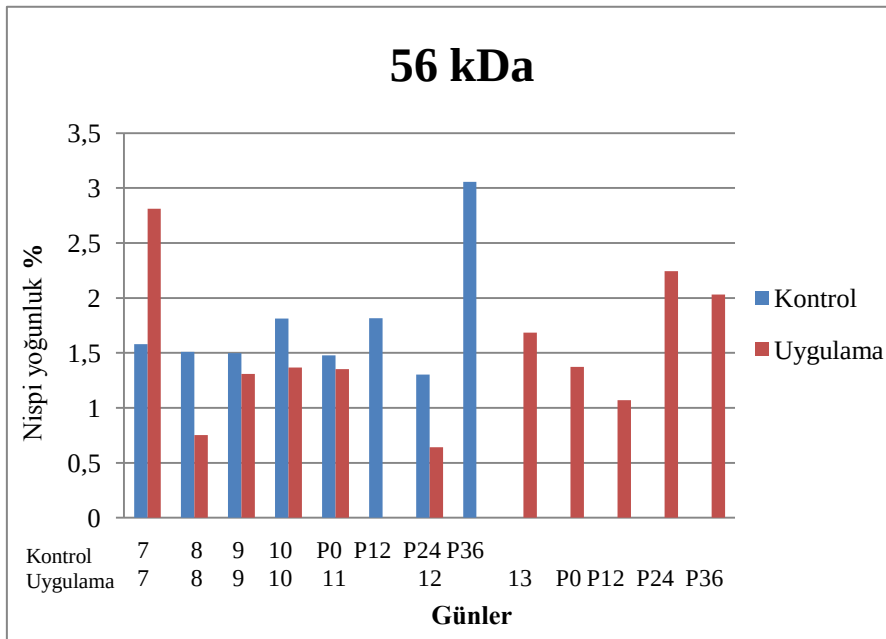
Şekil 3.17. 26 kDa protein bandının (fibroin proteini hafif zinciri) nispi yoğunluğu yüzdeleri



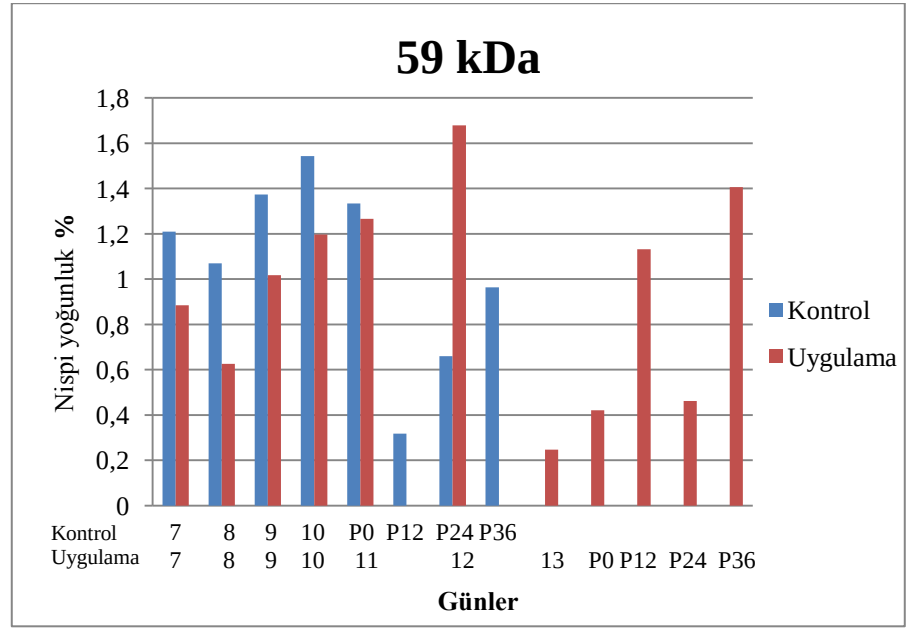
Şekil 3.18. 34 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri



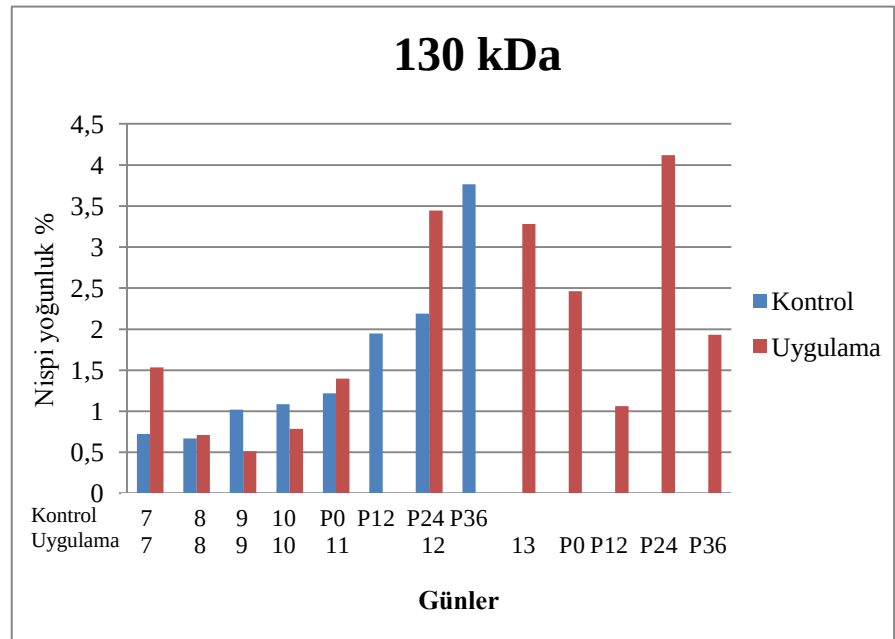
Şekil 3.19. 42 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri. Kontrol ve uygulama grubunda dejenerasyonun gerçekleştiği günler gösterdiği yükselişler bu proteinin programlanmış hücre ölümü ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 3.20. 56 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri. Uygulama grubunda kontrol grubuna göre daha düşük seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.21. 59 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri. Her iki grupta pupal evreye geçişle birlikte proteinin miktarında ani düşüş, pupal dönemin ilerleyen saatlerinde ise yavaşta olsa bir artış meydana geldiği gözlenmiştir.



Şekil 3.22. 130 kDa protein bandının nispi yoğunluğu yüzdeleri

4.TARTIŞMA

Tam başkalaşım geçiren böceklerde metamorfozu kontrol eden iki hormon 20E ve juvenil hormondur. Başkalaşım sürecinin araştırılmasında juvenil hormon analoglarının geliştirilmesi oldukça etkili olmuştur (Matolesy et al., 1988). Birçok böcek türünde larval gelişim sırasında uygulanan juvenil hormon analoglarının endokrin sistemi etkilediği bilinmektedir.

Farklı araştırmacılar PTTH tarafından uyarılması sonucu ekdisteroidleri salgılayan protorasik bezin juvenil hormon tarafından çeşitli yollarla etkilendiğini ortaya koymuştur. Rountree and Bollenbacher (1986) yaptıkları çalışmada juvenil hormonun PTTH salınımını inhibe ettiğini göstermiştir. Bununla birlikte juvenil hormonun protorasik bezi direkt olarak etkileyerek PTTH etkisine karşı duyarsızlaştırdığı yönünde bulgularda mevcuttur (Gu et al., 1997; Sakurai et al., 1989). Sakurai et al (1989) ipek böceği *Bombyx mori*'de son larval dönemin ilk gününde corpora allatayı (CA) uzaklaştırarak (allotoktemi) yaptığı çalışmada larval deri değişimi ile gut purge olayı arasındaki sürenin kısaldığını göstermiştir. Bitra and Palli (2009) ise yaptıkları çalışmada Juvenil hormonun, protorasik bez tarafından salgılandıktan sonra ekdizonun etkilerini düzenlediğini gözlemlemişlerdir. Son larval dönemde bir JHA olan fenoksikarbın yüksek dozda uygulanması larval karakterlerin devamlılığının sağlanması ve ergin kelebeklerinin oluşumunun engellenmesi dolayısı ile üremenin gerçekleşmemesine sebep olmaktadır (Sullivan, 2000).

Kamimura and Kiuchi (1998) tam başkalaşım geçiren ipek böceği *Bombyx mori*'de son larval dönemde 3 farklı fenoksikarb hassasiyet dönemi olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmaya göre ilk safha 0-2. günler arasındadır ve bu dönemde uygulanan fenoksikarbın larval dönemde doza bağlı olarak larval dönemi uzattığı gösterilmiştir. Çalışmamızda larval evrenin 0. günü yapılan düşük dozdaki fenoksikarb uygulamasının larval evreyi uzattığı tespit edilerek Kamimura and Kiuchi (1998) ile aynı yönde bulgular elde edilmiştir.

İpek bezi 3 bölümden oluşan ektodermal bir organdır. Posterior ipek bezi örme davranışı sırasında büyük miktarda fibroin proteini salgılar (Akai, 1984). Bu aşamadan sonra ise programlanmış hücre ölümü yoluyla dejenere olur.

Programlanmış hücre ölümü üzerine yapılan araştırmalarda apoptotik ve otofajik hücre ölümü tiplerinin birlikte ya da ayrı ayrı iş gördüğü bulgular mevcuttur.

Göncü (2008) tarafından gerçekleştirilen araştırmada ipek böceği *Bombyx mori* anterior ipek bezinde hem apoptotik hem otofajik tipteki programlanmış hücre ölümünün birlikte meydana geldiğini gösteren bulgulara rastlanmıştır. *Manduca sexta*'da yapılan diğer bir çalışmada 5. Larval dönemde yağ doku hücrelerinde meydana gelen değişimler incelenmiş ve bu dokuda gerçekleşen programlanmış hücre ölümünün otofajik karakterli olduğu görülmüştür (Müller et al., 2004).

Meyve sineği *Drosophila* tükürük bezinde, gen ifadeleri ve otofajik hücre ölümüyle ilişkili olduğu düşünülen atg genleri ile yapılan çalışmalarda dokuda her iki hücre ölümü tipinin gerçekleştiği ortaya çıkarılmıştır (Lee et al., 2003; Gorski et al., 2003; Pyo et al., 2005; Lum et al., 2005).

Çalışmamızda da larval-pupal değişim sürecinde posterior ipek bezinde meydana gelen dejenerasyon morfolojik ve biyokimyasal yönden araştırılmıştır. Araştırmamızın bulgularına göre posterior ipek bezinde hem apoptotik hem otofajik karakterli hücre ölümünün gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Posterior ipek bezi larvaya spesifik bir dokudur ve pupal dönemin başında dejenere olur (Kakei et. al., 2004). Yapılan çalışmalarda apoptozis yoluyla dejenere olan dokulardaki hücrelerin birbiriyle olan ilişkisinin azaldığı buna bağlı olarak hücre sınırlarının belirginleştiği, sitoplazmanın yoğunlaştığı ve nukleus yıkımının gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Goncu and Parlak, 2011; Kiess and Gallaher, 1998; Lee et al.; 2002). Benzer morfolojik bulgular posterior ipek bezi üzerinde yaptığımız çalışmada da görülmektedir.

Gama ve Landim (1984)'e göre, Hymenoptera ordosuna dahil böceklerden *Apis mellifera*'nın orta bağırsak epitelindeki hücreler larval dönemde dejenere olurken pupal dönemde bunların yerini yeni hücreler alır.

Vagner (2004)'de *Apis mellifera* orta bağırsağında yaptığı çalışmada asit fosfataz aktivitesinin son larval dönemde en yüksek seviyeye ulaştığını prepupal dönemde düşüşe geçtiğini, pupal dönemde ise larval düzeye göre oldukça düşük seviyelerde olduğunu gözlemlemiştir.

Zakarin (2007) çalışmasında *Apis mellifera* tükürük bezinde programlanmış hücre ölümünü araştırmıştır. Çalışmasının bulgularına göre 5. larval ve prepupal dönemde asit fosfataz aktivitesi belirlenmiş, bu dokular morfolojik olarak incelendiğinde ise otofajik vakuoller gözlemlenmiştir.

Cavalcante and Cruz-Landim (2004), çalışmalarında *Apis mellifera* metamorfoz sürecinde orta bağırsak dokusunda asit fosfataz aktivitesini, Bradford yöntemi ile protein miktarlarını ve SDS-PAGE ile protein profillerini gözlemlemişlerdir. Prepupal dönemde beslenme aktivitesi kesildiğinden lizozomal bir enzim olan asit fosfataz aktivitesinin ve yoğunlaşan protein bantlarının buradaki hücrelerin sindirimi ile ilişkili olduğu düşünülmüşlerdir.

Araştırmamızda Bradford ile protein tayini bulgularımızda her iki grupta dejenerasyonun gerçekleştiği günler total protein miktarlarında düşüş gözlenmiştir. Buna zıt olarak posterior ipek bezi larval dönemin sonu ve pupal dönemlerinde incelenmiş asit fosfataz enzim aktivitesinin pupal dönemde oldukça arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum ipek bezinin pupal dönemde işlevini yitirerek dejenere olmasında otofajik hücre ölümünün iş gördüğünü düşündürmektedir. Bulgular değerlendirildiğinde çalışma sonuçlarımızın diğer araştırmacılar ile uyduğu görülmektedir.

Protein miktarları belirlendikten sonra Protein profillerinin belirlenmesi için SDS-PAGE yöntemi uygulanmış ve gümüş boyama ile protein profilleri ortaya konmuştur. Larval dönemin son günlerinde ve pupal dönemin ilk günlerinde nispi yoğunlukları azalan ve artan bantlar değerlendirilmiştir.

SDS-PAGE sonuçlarımızda 18, 42, 56, 59, 130 kDa moleküler ağırlığa sahip protein bantlarındaki değişimler yorumlanmıştır. 18 kDa bandında hem kontrol hem 1 ng uygulama grubunda dejenerasyon sürecinde görülen düşüşler bu proteinin bezin fonksiyonu ile ilgili olduğunu düşündürmektedir. 42, 56, 59, 130 kDa ağırlığındaki protein bantlarındaki artış ise bu bantların dejenerasyon süreci ile ilişkili olarak artmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda ipek böceği *Bombyx mori* posterior ipek bezinde larval-pupal gelişim sürecinde juvenil hormon analogu fenoksikarbın posterior ipek bezi üzerine etkileri araştırılmış, fenoksikarb uygulamasının ekdisteroidlerin salınımını engelleyerek larval dönemin uzamasına yol açtığı ve posterior ipek bezi dejenerasyonunu geciktirdiği tespit edilmiş, kontrol ve uygulama gruplarında programlanmış hücre ölümü yoluyla meydana gelen dejenerasyonda apoptotik ve otofajik hücre ölümünün birlikte rol aldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte larval dönemin sonu ve pupal dönemin başındaki protein bantlarındaki değişimler değerlendirilerek azalan bantların bezin yapısına katılan, artan bantlarını ise dejenereasyon sürecinde rol alan proteinler olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akai, H.**, 1984, The Ultrastructure and Functions of the Silk Gland Cells of *Bombyx mori*, *Insect Ultrastructure*, 323-364 pp.
- Bitra, K. and Palli, S. R.**, 2009, Interaction of proteins involved in ecdysone and juvenile hormone signal transduction, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 70(2):90-105 pp.
- Cavalcante, V. M. and Cruz-Landim, C.**, 2004, Electrophoretic protein pattern and acid phosphatase activity in the midgut extracts of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) during metamorphosis, *Neotropical Entomology*, 33(2):169-172 pp.
- Chaitanya, R. K., Sridevi, P., Senthilkumaran, B. and Gupta D.**, 2011, 20-Hydroxyecdysone regulation of H-fibroin gene in the stored grain pest *Corcyra cephalonica*, during the last larval development, *Elsevier*, 76:125-134pp.
- Clarke, P. G.**, 1990, Developmental cell death morphological diversity and multiple mechanisms, *Anatomy and Embryology*, 195-213 pp.
- Daimon, T., Kozaki, T., Niwa, R., Kobayashi, I. and Furuta, K.**, 2012. Precocious Metamorphosis in the Juvenile Hormone–Deficient Mutant of the Silkworm, *Bombyx mori*, *PLoS Genetics* 8:(3).
- Dedos, S. G. and Fugo, H.**, 1996, Effects of Fenoxycarb on the Secretory Activity of the Prothoracic Glands in the Fifth Instar of the Silkworm, *Bombyx mori*, *General and Comparative Endocrinology*, 104:213-224 pp.
- Dedos, S. G., Szurdoki, F., Szekacs, A., Mizoguchi, A. And Fugo, H.**, 2002, Induction of Daurer Pupae by Fenoxycarb in the Silkworm, *Bombyx mori*, *Journal of Insect Physiology*, 48:857-865 pp.
- Delbecque JP., Weidner K., Hoffmann KH.**, 1990. Alternative sites for ecdysteroid production in insects. *Invert Reprod Devel*;18:29–42.
- Fedic, R., Zurovec, M. and Sehnal, F.**, 2003, Correlation between Fibroin Amino Acid Sequence and Physical Silk Properties, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 278:35255-35264 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fujimoto, Z., Suzuki, R., Shiotsuki, T., Tsuchiya, W., Tase, A., Momma, M. and Yamazaki, T., 2013,** Crystal Structure of Silkworm *Bombyx mori* JHBP in Complex With 2-Methyl-2,4-Pentanediol: Plasticity of JH-Binding Pocket and Ligand-Induced Conformational Change of the Second Cavity in JHBP, *PLoS One* 8(2).
- Gama, V. and Landim, C., 1984,** Morphology of the alimentary canal of *Comptonotus* (*Myrmothrix*) *rufipes* (Fabricius, 1775) (Hymenoptera, Formicidae) during metamorphosis, *Naturalia*, 9:43-55 pp.
- Gilbert, L. I., Song, Q. and Rybczynski, R., 1997,** Control of ecdysteroidogenesis: activation and inhibition of prothoracic gland activity, *Invert Neurosci*, 3:205–46 pp.
- Goodman, W. G. and Granger, N. A., 2005,** The juvenile Hormones. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors, *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, 6:55–115 pp.
- Goncu, E. and Parlak, O., 2008,** Some autophagic and apoptotic features of programmed cell death in the anterior silk glands of the silkworm, *Bombyx mori*, *Autophagy*, 4(8):1069-1072 pp.
- Goncu, E. ve Parlak, O., 2011,** The influence of juvenile hormone analogue, fenoxycarb on the midgut remodeling in *Bombyx mori* (L., 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) during larval-pupal metamorphosis, *Turkish Journal Of Entomology* 35(2):179-194 pp.
- Gorski, S. M., Chittaranjan, S., Pleasance, E. D., Freeman, J. D., Anderson, C. L., Varhol, R. J., Coughlin, S. M., Zuyderduyn, S. D., Jones, S. J. M. and Marra, M. A., 2003,** A SAGE Approach to Discovery of Genes Involved in Autophagic Cell Death, *Current Biology*, 13(4):358-363 pp.
- Gözüaçık, D. and Kimchi, A., 2004,** Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, *Oncogene* 23:2891-2906 pp.
- Gu, S., Chow, Y. and Yin, C., 1996,** Involvement of juvenile hormone in regulation of prothoracicotropic hormone transduction during the last larval instar of *Bombyx mori*, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 127:109-126 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Henrick, C. A., Staal, G.B. and Siddall J. B.,** 1976, Structure activity relationships in some juvenile hormone analogs. In: Gilbert LI, editor. *The Juvenile Hormones, New York: Plenum imi*, 48–60 pp.
- Kamimura, M. and Kiuchi, M.,** 1998, Effects of a juvenile hormone analog, fenoxycarb, on 5th stadium larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae), *Applied Entomology and Zoology*, 33(2):333-338 pp.
- Kiess, W. and Gallaher B.,** 1998, Hormonal control of programmed cell death/apoptosis, *European Society of Endocrinology*, 138:482-491.
- Lee, C. Y., Clough, E. A., Yellon, P., Teslovich, T. M., Stephan, D. A. and Baehrecke, E. H.,** 2003, Genome-wide analyses of steroid- and radiation-triggered programmed cell death in *Drosophila*, *Current Biology* 13:350-357 pp.
- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J. T. and Rees, H. H.,** 2005, Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive molecular insect science. Oxford: Elsevier*, 125–195 pp.
- Laemmli, U. K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685 pp.
- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z.,** 2004, Caspase-independent cell death?, *Oncogene*, 23:2766-2773.
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T. And Thompson, C. B.,** 2005, Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis, *Elsevier*, 120(2):237-248 pp.
- Marchal, E., Vandersmissen, H. P., Badisco, L., Van de Velde, S., Verlinden, H., Iga, M., Van Wielendaele, P., Huybrechts, R., Simonet, G., Smagghe, G. and Broeck, J. V.,** 2010, Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: A review, *Elsevier*, 506-519 pp.
- Matolcsy, G., Nadasy, M. and Andrisk, V.,** 1988, Pesticide Chemistry: Studies in Environmental Science, *Elsevier*, New York.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Matsuura, S., Morimoto, T., Nagata, S. and Tashiro, Y.,** 1968, Studies on the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori* cytolytic processes in posterior silk gland cells during metamorphosis from larva to pupa. *The journal of cell biology*, 38:589-603 pp.
- Milligan, C. and Schwartz, L.,** 1997, Programmed cell death duuring animal development. *The British Council*, 52:570-590 pp.
- Mizoguchi, A. and Kataoka, H.,** 2005, An in vitro study on regulation of prothoracic gland activity in the early last-larval instar of the silkworm *Bombyx mori*, *Journal of Insect Physiology* 5:871–879 pp.
- Mondal, M., Trivedi, K. and Nirmal Kumar, S.,** 2007, The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review, *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 5(2):65-67 pp.
- Müller, F., Adori, C. and Sass, M.,** 2004, Autophagic and apoptotic features during programmed cell death in the fat body of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*), *Elsevier*, 83(2):67-78 pp.
- Parlak, O.,** 2001, İpekböceği Biyolojisi, Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir.
- Plantevin, G., Bosquet, G., Calvez, B. and Nardon, C.,** 1987, Relationships between juvenile hormone levels and synthesis of major haemolymph proteins in *Bombyx mori* larvae, *Elsevier*, 86(3):501-507 pp.
- Pyo, J. O., Jang M. H., Kwon, Y. K., Lee, H. J., Jun, J. I., Woo, H. N., Cho, D. H., Choi, B. Y., Lee, H., Kim, J. H., Mizushima, N., Oshum, Y. and Jung, Y. K.,** 2005, Essential Roles of Atg5 and FADD in Autophagic Cell Death Dissection Of Autophagic Cell Death Into Vacuole Formation and Cell Death, *The Journal of Biological Chemistry*, 280:20722-20729 pp.
- Ogawa, N., Kishimoto, A., Asano, T. and Izumi, S.,** 2005, The homeodomain protein PBX participates in JH-related suppressive regulation on the expression of major plasma protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35:217–229 pp.
- Öz Arslan, D., Korkmaz, G. ve Gözüaık, D.,** 2011, Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(4):184-194 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reza, A. M. S., Kanamori, Y., Shinoda, T., Shimura, S., Mita, K., Nakahara, Y., Kiuchi, M. and Kamimura, M.,** 2004, Hormonal control of a metamorphosis-specific transcriptional factor Broad-Complex in silkworm, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 139:753–761 pp.
- Rountree, D.B. and Bollenbacher W. E.,** 1986, The release of the prothoracicotropic hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, is controlled intrinsically by juvenile hormone, *The Journal of Experimental Biology*, 120:41-58 pp.
- Sakurai, S., Okuda, M. and Ohtaki, T.,** 1989, Juvenile hormone inhibits ecdysone secretion and responsiveness to prothoracicotropic hormone in prothoracic glands of *Bombyx mori*, *Elsevier*, 75(2):222-230 pp.
- Sass , M., Komuves, G., Csikos, G. and Kovacs, J.,** 1989, Changes in the activities of lysosomal enzymes in the fat body and midgut of two lepidopteran insects (*Mamestra brassicae* and *Pieris brassicae*) during metamorphosis, *Elsevier*, 92(3):285-289 pp.
- Sehnal, F. and Zurovec, M.,** 2004, Construction of Silk Fiber Core in Lepidoptera, *Biomacromolecules*, 5(3):666–674 pp.
- Silva-Zacarin, E. C. M.,** 2007, Autophagy and Apoptosis Coordinate Physiological Cell Death in Larval Salivary Glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *Autophagy*, 3(5):515-517 pp.
- Sullivan, J. J.,** 2010, Chemistry and Environmental Fate of Fenoxycarb, *Environmental Contamination and Toxicology*, 202:155-184 pp.
- Suzuki, R., Fujimoto, Z., Shiotsuki, T., Tsuchiya, W., Momma, M., Tase, A., Miyazawa, M. and Yamazaki, T.,** 2011, Structural mechanism of JH delivery in hemolymph by JHBP of Silkworm *Bombyx mori*, *Scientific Reports*, 133.
- Tashiro, Y., Morimoto, T., Matsuura, S. and Nagata, S.,** 1968, Studies on the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. Growth of posterior silk gland cells and biosynthesis of fibroin during the fifth larval instar, *The Journal of Cell Biology*, 38:574-588 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Staykova, T.A., Ivanova, E. N., Tzenov, P. I., Vasileva, Y. B., Arkova-Pantaleeva, D. B. and Petkov, Z. M.,** 2010, Acid phosphatase as a marker for differentiation of silkworm *Bombyx mori* strains. *Biotechnol*, Eq 24.
- Wilson, T. G.,** 2004, The Molecular Site of Action of Juvenile Hormone and Juvenile Hormone Insecticides during Metamorphosis: How These Compounds Kill Insects, *Journal of Insect Physiology*, 50:11-121 pp.
- Yamamoto, K., Chadarevian, A. and Pelligrini, A.,** 1988, Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase C, *Science*, 239:916–919 pp.
- Zakeri, Z., Quaglino, D., Latham, T., Woo, K. and Lockshin, A.,** 1996, Programmed cell death in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: Alteration in protein synthesis, *Microscopy Research and Technique*, 34(3):192-201 pp.

ÖZGEÇMİŞ

02.09.1988’de Uşak’ta doğdu. İlkokulu Osman Zeki Üngör İlköğretim Okulu ve liseyi Şehit Binbaşı Bedir Karabıyık Lisesi’nde okudu. 2006 yılında liseden mezun oldu ve aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde öğrenim görmeye hak kazandı. 1 yıl hazırlık ve 4 yıllık örgün öğrenimin ardından 2011 yılında Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı’ndan mezun oldu. Aynı yılın Eylül ayında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümünde yüksek lisans programına kabul edildi. 2015 Mart ayında tez çalışmasını tamamladı.