

İpekböceği *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) Beyin Nörosekresyon Hücrelerinde Beşinci Larval Evre Süresince Hemolenf Ekdisteroid Değişmelerine Bağlı Farklılıkların Araştırılması

Osman PARLAK

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bornova, İzmir - TÜRKİYE

Güler ÜNAL

100. Yıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.12.1996

Özet : Bu çalışmada, ipekböceği hemolenfinde radioimmunoassay (RIA) ile belirlenen ekdisteroid miktarı değişmelerine bağlı olarak beyin pars interserebralis (PIC) bölgesinin lateral nörosekresyon hücrelerinde meydana gelen değişiklikler paraldehid fuksin (PAF) boyama yöntemi kullanılarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

Beşinci larval safhada ipekböceği beyinleri hemolenf değerinin düşük ve yüksek olduğu günlerde (5, 6, 7. gün) tesbit solüsyonuna (Bouin) alınmış ve dehidratasyondan sonra alınan kesitler PAF ile boyanmıştır.

Sonuçta, hemolenfteki ekdisteroid seviyesi yükselmeden önce, nörosekresyon hücrelerinin sitoplazmalarında yoğunluğun arttığı ve ince salgı granülleri ile kaplandığı, salgının boşlamasını takip eden günde ise hemolenfteki ekdisteroid seviyesinin yükseldiği tesbit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler : *Bombyx mori*, Radioimmunoassay, Ekdisteroid, pars interserebralis.

Differentiation of Brain Neurosecretory Cells Depending on Ecdysteroid Content of Haemolymph During 5 th. Instar Larval Stage of Silkworm, *Bombyx mori*

Abstract : In this study, the differentiation in the lateral neurosecretion cells of pars intercerebralis of brain, depending on the different ecdysteroid contents which was determined in the hemolymph of silkworm by radioimmunoassay has been studied using light microscopy.

The brains of silkworms in the time of low and high hemolymph ecdysteroid content were fixed in Bouin solution, and the cross sections were stained with PAF after dehydration.

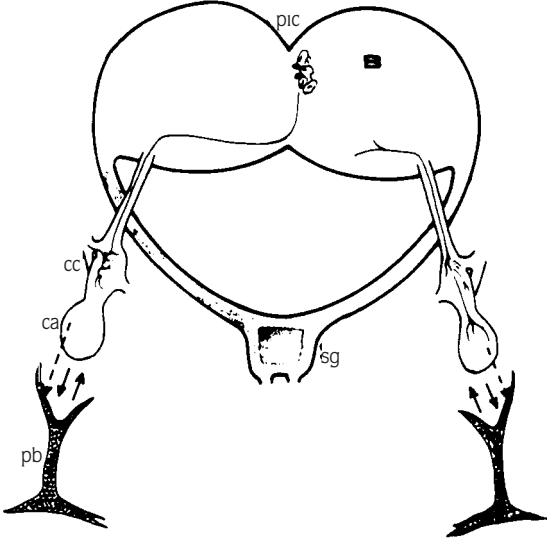
Results shown that the density of fine secretion granules increased in the cytoplasm of neurosecretion cells just before the increase of ecdysteroid content in hemolymph. It was also observed that the ecdysteroid content in hemolymph increased in the following day of excretion.

Key Words : *Bombyx mori*, Radioimmunoassay, Ecdysteroid, pars intercerebralis.

Giriş

Böceklerde büyüme ve gelişmeyi kontrol eden mekanizmanın açıklığa kavuşturulmasında beyin nöroksekresyon hücreleri üzerindeki araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Böceklerde metamorfoz olayı nöroksekresyon hücrelerine bağlı olarak endokrin sis-

temin kontrolü altında değişik yollar izleyerek gerçekleşir. Bu yol; beyin-korpora kardiaka - korpora allata'yı takip ederek protorasik beze ulaşır (Şekil 1). Nöroksekresyonun kendi hücre aksonları ile aynı yolu takip ederek protorasik bezi uyardığı Morohoshi (1); Akai (2, 3, 4); Mizoguchi (5); Sakurai (6, 7); tarafından belirtilmiştir.



Şekil 1. İpekböceğinde (*B.mori*) endokrin sistem şeması PIC: pars interserebrali, B: beyin, cc: korporakardiaka, ca: korpora allata, sg: subosefajial ganglion, pb: protorasik bez.

Protorasik bezi uyaran prothorasikotropuk hormon (PTTH) peptid yapısında bir nörosekresyondur ve bezi uyarak ekdizon salınmasını teşvik eder (8). Ekdizon hormonu ise deri değişimi ve metamorfozu kontrol eder (9).

Böceklerde larval ve pupal metamorfozun gerçekleşmesinde ekdizon kadar korpora allata tarafından salınan juvenil hormonun da rolü vardır. Bu bezin aktivitesi beyin hücreleri tarafından kontrol edilmektedir (7), Juvenil hormonunun miktarı ise protorasik bez ile karşılıklı etkileşimi sonucu ayarlanmaktadır (10). Aynı etkileşim protein metabolizmasını da ayarlamaktadır (1).

Bir yabancı ipekböceği *Antheraea pernyi* üzerinde çalışan Zhang (11), beyinde üç ayrı grup nörosekresyon hücresinin bulunduğunu ve bunların aktivitelerinde gelişme safhalarına göre değişikliklerin olduğunu rapor etmiştir.

Bu çalışmadaki ipekböceği beşinci larval evresinde olduğu gibi, diğer larval evrelerin hemolenf ekdizon değerleri Kiuchi (1992) ve pupal evre hemolenf ekdizon değerleri Hanaoka (1974) tarafından ele alınmıştır.

Çalışmamızda ise, *Bombyx mori* ipek bezlerindeki salgının hızla arttığı, imajinal disklerin büyümeye başladığı ve ekdizon değerinin diğer evrelere göre çok daha fazla olduğu beşinci larval evre ele alınarak hemolenf ekdisteroid değerleri tesbit edilmiş ve PIC hücrelerinde meydana gelen sitoplazmik değişimler ortaya koyulmuştur.

Materyal ve Metot

İpekböceğinin yetiştirilmesi:

Yetiştirme odasında yumurtadan çıkan ipekböceği larvaları (Japon orijin, J-85) $25\pm 1^\circ\text{C}$ ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyoda, %70 nemliliğe ayarlı sabit ısı odasında taze dut yaprakları ile beslenmiştir.

Beşinci larval safhaya deri değiştiren hayvanların beyinleri 5, 6, 7. günlerde çıkarılarak Boin solüsyonunda tesbit edilmiş ve daha sonra suyu alınan doku parafine gömülerek parafin bloklar hazırlanmıştır. 7 mikron kalınlığında alınan kesitler paraldehid fuxin (PAF) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiş ve nörosekresyon hücrelerinin değişik günlerdeki fotoğrafları çekilmiştir.

Hemolenfteki Ekdisteroid değerlerinin belirlenmesi:

Beşinci larval safhanın sıfırncı gününden başlayarak sekiz gün süre ile her 12 saatte bir üç ayrı hayvan kanından alınan 20 μl hemolenf 400 μl metanol ilave edilerek 8000 devirde 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra sıvı faz alınarak küçük cam tüplere koyulmuş ve argon gazı geçirilerek buharlaştırılmıştır. Radioimmüsay (RIA) için tüplere eşit oranda Borate Buffer (pH: 8.2), 3H-ekdizon ve antiserum ilave edildikten sonra sintillasyon sayacında sayımı yapılarak ekdizonun antiseruma bağlanma yüzdelerini gösteren standart eğri elde edilmiştir. daha sonra aynı seri, hazırlanan deney tüplerindeki hemolenf ekdizonlarına uygulanarak her gün için hemolenfin içerdiği ekdizon değerleri ng/ml olarak ortaya çıkarılmıştır (12).

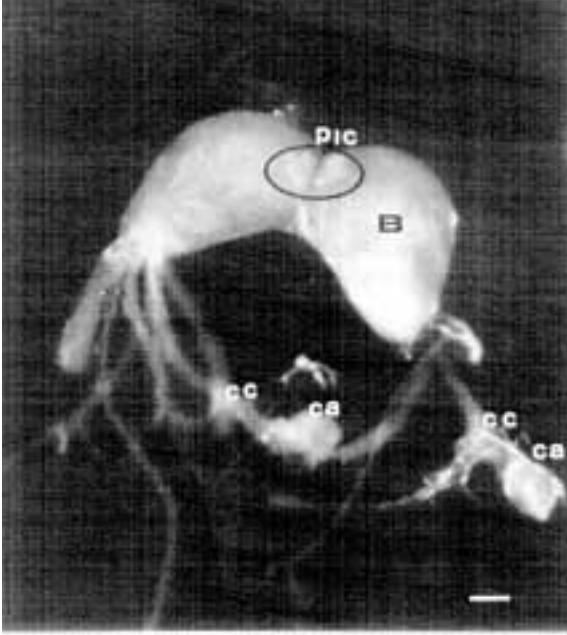
Bulgular

İpekböceği Beyinlerinin Total İncelenmesi:

Işık mikroskopunda yapılan total incelemede beyin pars interserebralis sağ ve sol lateral bölgelerinde 4 er adet olmak üzere toplam 8 adet nörosekresyon hücresinin varlığı belirlenmiştir (Şekil 2). Hücreler, hafif köşeli yuvarlak veya oval şekilli, sitoplazmaları beyin dokusuna göre daha açık renkli, birbirlerine çok yakın konumda olup her iki tarafa da iki grup oluşturmaktadırlar. Çapları yaklaşık 20-30 μm arasındadır.

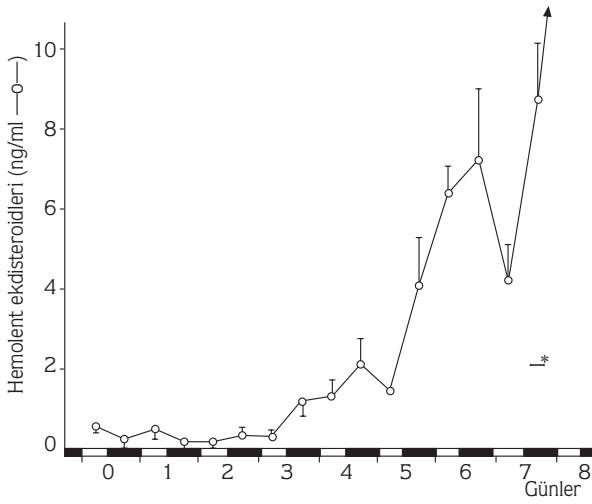
Hemolenfteki Ekdisteroid değerlerindeki değişimler:

Beşinci larval safhanın ilk üç günü hemolenfteki ekdisteroid değerleri çok düşük seviyelerde seyrettiği halde (3-5 ng/ml) 3. günden itibaren artmaya başladığı ve bu



Şekil 2. İpekböceğinde (*B. mori*) beynin total görünüşü
O: pars interserebralis bölgesi, cc: korpora kardiaca, ca: korpora allata, skala: — 100 µm

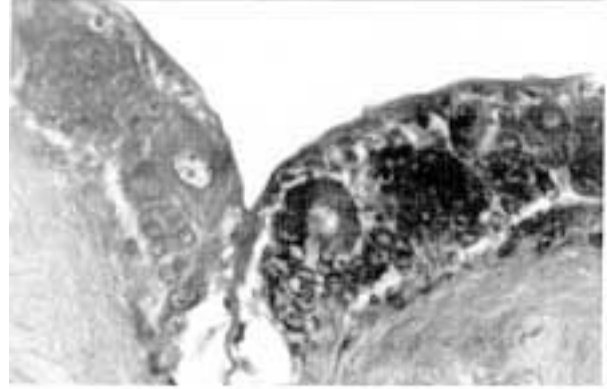
artışın altıncı güne kadar devam ettiği tesbit edilmiştir (Şekil 3). Ekdisteroid değeri 7. günde bir miktar düşme gösterirken 8. günde ekdisteroid değerinin 16.5 ± 5.3 ng/ml ye kadar çıktığı tesbit edilmiştir.



Şekil 3. İpekböceğinde (*B. mori*) 5. larval safha süresince hemolenfteki ekdisteroid değişim grafiği. Sekizinci gün (fotofaz) hemolenf ekdisteroid miktarı 16.5 ± 5.3 ng/ml *: ipek salgılama evresi, (10). Her nokta 5 ayrı ölçümün ortalamasıdır. \pm SD.

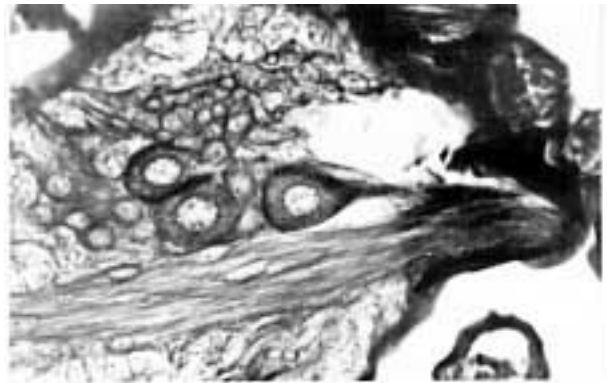
Nörosekresyon hücre sitoplazmalarında meydana gelen değişimler:

Beşinci larval safha süresince hemolenfdeki ekdisteroid miktarının artışına ve azalışına paralel olarak beyindeki nörosekresyon hücrelerinin sekresyon yoğunluğu bakımından değişikliğe uğradığı belirlenmiştir. Yapılan ışık mikroskobu incelemelerinde, bu evrenin beşinci gününden itibaren hücre sitoplazmalarında ince granüllerin hızlı bir şekilde birikmeye başladığı tesbit edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. İpekböceğinde (*B. mori*) 5. larval evre beşinci gün nörosekresyon hücreleri. X200

Altıncı günde bu artışın iyice hızlandığı ve hücre sitoplazmalarının ince granüllerle yoğun olarak kaplandığı görülmüştür (Şekil 5). Hemolenfdeki ekdisteroid miktarının düşmeye başladığı 7. günde ise; nörosekresyon hücrelerindeki salgı yoğunluğunun azaldığı ve adeta hücre sitoplazmasının boşalarak önceki yoğunluğunu tamamen kaybettiği saptanmıştır (Şekil 6).



Şekil 5. İpek böceğinde (*B. mori*) 5. larval evre altıncı gün nörosekresyon hücreleri. X200



Şekil 6. İpekböceği (*B. mori*) 5. larval evre yedinci gün nörosekresyon hücreleri X200.

Tartışma

B. mori beyinde de diğer ipekböceklerinde olduğu gibi lateral konumda iki grup halinde nörosekresyon hücreleri bulunmaktadır. Bu hücrelerin akson uzantıları ve bağlantı halinde olduğu endokrin bezlerdeki salgı granülleri Morohoshi (1), Akai (2), Zhang (11) tarafından ipekböceğinde gösterilmiştir. Nörosekresyon hücrelerinde belirlediğimiz sitoplazmik yoğunluk salgı granüllerinin artışından ileri gelmektedir.

Beynin protorasik bez üzerindeki direk etkisi ise Sakurai (6, 7) tarafından yapılan organ kültürü çalışmaları ile

açık olarak ortaya koyulmuştur. Çalışmamızın birinci bölümünde de; 5. larval safha süresince beyin etkisi altındaki protorasik bez tarafından hemolenfe salınan ekdizon düzeyi tesbit edilerek protorasik bezin aktif olduğu dönemler belirlenmiştir. İkinci bölümünde ise, protorasik bezin beyin etkisi altında kalıp kalmayışına göre nörosekresyon hücrelerindeki değişimler gözlemlenmiştir. Sonuçlar, Sakurai (6) in de çalışmalarında belirttiği gibi, beyin protorasik bez üzerinde etkili olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Çünkü, nörosekresyon hücrelerindeki salgının artmasından sonra protorasik bez uyarılmakta ve hemolenfe ekdisteroid verilmektedir. Sonuçlarımız, bu bulguların radioimmunoassay verilerine göre doğruladığı gibi histolojik olarak da teyit etmektedir. Ayrıca, beşinci larval evreye ait histolojik bulguların diğer larval evreler ve pupal evre için de geçerli olduğu ortaya çıkmaktadır. Burada elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda bir noktayı önemle belirtmek gerekmektedir; nörosekresyonun ancak bir gün sonra protorasik bezi etkisi altına alarak uyardığı kritik peryot olarak ortaya çıkmaktadır. Zira, nörosekresyondaki yoğunluğun çok fazla olduğu dönemde henüz protorasik bez uyarılmadığı için hemolenfdeki ekdisteroid seviyesinin düşük kaldığı ancak ertesi gün protorasik bezin uyarılması nedeniyle hemolenfdeki ekdisteroid miktarının yükseldiği görülmektedir.

Kaynaklar

1. Morohoshi., Control in *Bombyx mori* of the hormonal antagonistic balance regulating development by the brain hormone. The ultra-structure and Functioning of insect cells. (Ed. H. Akai et al.), pp. 109-112, 1982.
2. Akai, H., Hormonal regulation of larval development and its utilization in silk production by *Bombyx* silkworm. Tropical Agriculture Research Center. Reprinted from JARQ Vol. 22, No. 2, pp. 128-134, 1988.
3. Akai, H., Changes of ecdysteroid levels of *Bombyx* larvae after JH and ecdysterone treatments. The journal of sericultural science of Japan. Vol: 58, No: 5, pp. 436-438, 1989.
4. Akai, H., Endocrine system of insects. In atlas of endocrine organs, in vertebrates and invertebrates. Ed. Kobayashi, E., Kodansha, Tokyo, pp. 132-145, 1987.
5. Mizoguchi, A., Oka, T., Kataoka, H., Nagasawa, H., Suzuki, A., Ishizaki, H., Immunohistochemical localization of prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the brain of *Bombyx mori*. Develop. Growth and Differ., 32 (6), pp. 591-598, 1990.
6. Sakurai, S., Imokawa, H., Developmental Arrest Induced by Juvenile Hormone in Larvae of *Bombyx mori*. Archives of Insect Biochemistry and physiology, (8), pp. 219-228, 1988.
7. Sakurai, S., Okuda, M., Ohtaki, T., Juvenil hormone inhibits ecdysone secretion and responsiveness to prothoracicotropic hormone in prothoracic glands of *Bombyx mori*. Gen. Comp. Endocr., vol. 75, pp. 220-230, 1989.
8. Ishizaki, H., Suzuki, A., Moriya, I., Mizoguchi, A., Fujishita, M., O'oka, H., Kataoka, H., Isogai, A., Nagasawa, H. and Suzuki, A., Prothoracicotropic hormone bioassay: pupal adult *Bombyx* assay. Develop. Growth & Differ., vol. 25, pp. 585-592, 1983.
9. Truman, J. W., Neuroendocrine Control of Ecdysis. Molting and Metamorphosis (Ed. E. Ohnishi and H. Isizaki), pp. 67-82. Japan sci. soc. press. Tokyo. 1990.
10. Nijhout, J. F., Williams, C. M., Control of molting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.); cessation of juvenil hormone secretion as a trigger for pupation. J. Exp. Biol. 61, 493. 1974.

11. Zhang, Y., Lu, M., Xu, Q., Studies on neurosecretory cells of the brain and suboesophageal ganglion of the oak silkworm, *Antheraea pernyi*. International Society for Wild Silmoths, Ed. H. Akai and M. Kiuchi., WILD SILKMOTHS '89, 90' pp, 23-34, 1991.
12. Kiuchi, M., Changes in the Hemolymph Ecdysteroid Titres During the Larval Development in *Antheraea yamamai* and *Bombyx mori*. International Society for Wild Silmoth, Ed. H. Akai and M. Kiuchi., WILD SILKMOTH '91', pp. 83-90, 1992.
13. Hanaoka, K., Ohnishi, E., Change in ecdysone titre during pupal-adult development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 20, 2374, 1974.
14. Parlak, O., Sakurai, S., Kaya, M., Ohtaki, T., Content and possible role of ecdysteroids in the larval ovary of the silkworm, *Bombyx mori*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 21: 1, pp. 1-6 1992