

## ***Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae)'nin Gelişim Evrelerinde Beynin Histolojik Açından Araştırılması <sup>[1]</sup>**

Serap TUFAN \* Ayla ÖBER \* Gamze TURGAY İZZETOĞLU \* 

[1] Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (2004 Fen 025) kapsamında desteklenmiştir

\* Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı, İzmir - TÜRKİYE

**Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-118**

### **Özet**

İpekböceğinin (*Bombyx mori* Linnaeus, Lepidoptera: Bombycidae) gelişim evrelerine göre beyin nörosekresyon hücrelerinde meydana gelen değişiklikler belirlendi. *Bombyx mori*'nin geç larval, pupal ve ergin evrelerinden çıkarılan beyinler paraldehid-fuchsine (PAF-Gabe) ile boyanarak histolojik açıdan incelendi. PAF ile verdikleri reaksiyona göre pars interserebraliste (PIC) üç tip (NSH-1, NSH-2, NSH-3), pars lateraliste (PL) ise tek tip (NSH-L) hücre saptandı. Gelişme sırasında beyinde meydana gelen morfolojik değişimlere ek olarak, bu hücrelerin lokalizasyonlarında da bazı değişiklikler olduğu belirlendi. Ayrıca bu hücrelerin boyanma özelliklerinde sekresyon aktivitesine bağlı farklılıklar da gözlemlendi. PIC'in NSH-1 hücrelerinde yoğun madde içeren bir sitoplazmik vakuol bulunması tipiktir. *B. mori* üzerinde yapılan bu çalışma; onların gelişim sürecinde beyin nörosekresyon hücrelerinin lokalizasyonları ve boyanma özellikleri açısından bir takım değişikliklerin meydana geldiğini, nörosekresyon materyalinde de artma veya azalmalar olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Bombyx mori*, Beyin, Nörosekresyon hücreleri

## **Histological Investigation of the Brain at the Developmental Stages of *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae)**

### **Summary**

This study was to identify the modifications of brain neurosecretory cells at the developmental stages of the silkworm (*Bombyx mori*). Brains were dissected out at late larval, pupal and adult stages and stained with paraldehyde fuchsine (PAF-Gabe) for histological examination. Three types of neurosecretory cells in pars intercerebralis (PIC) and one type in pars lateralis (PL) were determined by staining properties with paraldehyde-fuchsine (PAF-Gabe). In addition to morphological modifications occurred in brain during development, some changes were defined at localizations of neurosecretory cells. Some changes were observed by staining properties of these cells in depend on their secretory activities too. It was typical that NSH-1 cells of PIC have a cytoplasmic vacuole containing dense material. However, it was not identified what the material is in these vacuoles. It was considered that there were occurred some changes and increased or decreased on their neurosecretion material in the neurosecretory cells relation with their locations and staining properties during development in *B. mori*.

**Keywords:** *Bombyx mori*, Brain, Neurosecretory cells

### **GİRİŞ**

Tam metamorfoz geçiren (*holometabol*) ipekböceğinin gelişiminde, her biri deri değişimi ile sonlanan beş larval evre vardır ve ipekböceği beşinci larval evrenin sonunda koza örüp pupal evreye geçerek yaklaşık 10-15 gün sonra ergin olmaktadır <sup>1</sup>.

merkezi sinir sistemi; *cerebral* ve *suboesophageal* ganglion ile *ventral sinir şeridi*'nden meydana gelmektedir. En büyük ganglionik yapı olan serebral ganglion (beyin) iki lobdan oluşmakta ve baş bölgesinde özofagusun hemen üzerinde yer almaktadır <sup>2,3</sup>.

Diğer böceklerde olduğu gibi ipekböceğinde de

Böcek nöroendokrin sisteminde yer alan tüm gang-



**İletişim (Correspondence)**



+90 232 3884000/1791



gamze.turgay@ege.edu.tr

lionlar, sitoplazmalarında bulunan karakteristik kromofilik materyalleri sayesinde boyanabilen özel hücrelere (nörosekresyon hücresi) sahiptir <sup>4</sup>. Bu hücrelerin çoğunun uzantıları, salgıyı hemolenfe bırakmak üzere nörohedral bölgelerde (*CC-corpora cardiacum*, *CA-corpora allatum*) sonlanmaktadır. Lepidoptera ordosu için tipik olan bir diğer nörohedral organ, ventral sinir şeridi üzerinde yer alan **H organı** olup bu yapının Orthoptera ordosunun bazı üyelerinde de bulunduğu gösterilmiştir <sup>3,5</sup>.

Nörosekresyon hücreleri salgılarının (nörohormon) omurgalılarda olduğu gibi böceklerde de üreme, gelişim ve homeostazisin düzenlenmesinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Bu hücreler özellikle beyin *pars intercerebralis* (PIC) ve *pars lateralis* (PL) bölgelerinde gruplar oluşturmaktadır <sup>6-8</sup>. Nörosekresyon hücrelerinin; *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)'da pupal diyapoz <sup>9,10</sup>, şeker metabolizması ve diürezis <sup>11</sup>, *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae)'ta kütiküler renklenme <sup>12</sup>, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)'de yumurta gelişimi <sup>13</sup>, deri değişimi, metamorfoz <sup>14</sup> ve eklozyonla (pupa kılıfının açılması) <sup>15</sup> ilişkili oldukları gösterilmiştir.

Beyin nörosekresyon hücreleri ilk olarak 1930'lu yıllarda gösterilmiş <sup>16,17</sup>, daha sonra Shiga; dipter larvalarında <sup>8</sup>, Panov; *B. mori* de dahil olmak üzere 54 lepidopter türünde <sup>6</sup>, Copenhaver ve Truman; *M. sexta*'da <sup>18</sup> bu hücrelerle ilgili histolojik çalışmalar yapmışlardır. Nörosekresyon materyali aldehit fuksin ve azan gibi boyalar <sup>19</sup> dışında, lusifer sarısı <sup>20,21</sup>, kobalt difüzyon ve çöktürme tekniği <sup>22,23</sup> ya da elektron mikroskopu <sup>7</sup> ile belirlenmeye çalışılmıştır. 1990'lı yıllarda immünohistokimyasal yöntemlerin gelişmesiyle, hücrelerin sentezledikleri belirli ürünlerin gösterilebilmesi mümkün olmuştur. Mizoguchi ve ark. *B. mori*'de bu yöntemle, deri değişimi ve metamorfozu düzenleyen ekdizonu salgılamak üzere protorasik bezi uyaran bir peptid olan protorasikotropik hormonun, beyin dorso-lateralinde bulunan iki çift nörosekresyon hücresi tarafından salgılandığını saptamışlardır <sup>14</sup>. Aynı yöntemle *B. mori* beyininde dört çift dorso-medial hücrenin büyümede önemli olan bombyxin adlı maddeyi içerdikleri gösterilmiştir <sup>24,25</sup>.

*B. mori*'nin yaşam döngüsünde 4. ve 5. larval evreler son derece önemlidir. Daha sonraki aşamalarda karşılaşılabilecek fizyolojik olaylarla ilgili gelişmeler bu evrelerde belirlenmektedir <sup>1,2</sup>. Bu nedenle çalışmada 4. ve 5. evredeki larvaların, pupaların ve erginlerin beyinlerinde bulunan nörosekresyon hücreleri dikkate alınmıştır.

Bu çalışmada; farklı gelişim evrelerindeki ipekböceğinin beyininde, olayları yönlendirecek kimyasalların üretimiyle ilgili değişimlerin hangi düzeyde (morfolojik-miktarsal) olduğunu ortaya koymak amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### *İpekböceğinin Yetiştirilmesi*

İpekböceği yetiştirilirken enfeksiyon riskini en aza indirmek için kültür odası ve kullanılan malzemeler temizlendi. Bu amaçla, yetiştirme sırasında kullanılacak malzemeler önceden yıkanıp sterilize edildi. Ayrıca kültür odasının duvarları kireç badana yapıldı, oda ve malzemeler %3'lük formaldehit püskürtülerek dezenfekte edildi. Normal gelişme ve beslenme için gerekli optimum şartlar (25±1°C sıcaklık, yaklaşık %70 nem ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olmak üzere uzun gün fotoperiyodu) sağlandı <sup>26,27</sup>.

Önemli bir ekonomik değere sahip olan *Bombyx mori*'nin hibrid yumurtaları Bursa Koza Birlik'ten temin edildi. Yumurtadan çıkan larvalar Ege Üniversitesi Kampüsü'ndeki taze dut yaprakları ile beslendi.

### *Uygulamalar*

İpekböceklerinin larval evresinde her deri değişim döneminde sonra beslemenin yapıldığı ilk gün, "0. gün", uyku haline geçtikleri gün ise "sonuncu gün" olarak alındı. Aynı şekilde, 5. larval evrenin sonunda koza içinde bulunan nimflerin deri değiştirdikleri gün de, pupal evre için "0. gün" olarak kabul edildi.

Örnekler, her larval evrenin 0. ve sonuncu, pupal evrenin 0, 6 ve sonuncu günleri ile eklozyonu takip eden ilk 2 gün içerisindeki ergin böceklerden alındı. Eşey ayırımı 4. larval evrenin sonuna doğru yapılabildiği için, dişi ve erkek bireyler 4. larval evrenin sonundan itibaren ayrı ayrı değerlendirilerek bundan önce herhangi bir ayırım gözetilmedi. Her larval evre için 0. ve sonuncu günlerde 20'şer örnek, 4. larval evre sonundan itibaren 15'er dişi - 15'er erkek bireyin beyinleri çıkarıldı (toplam 380 disseksiyon yapıldı).

Bouin fiksatif ile tespit edilen beyinlerden 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve her grup için yeterli kanıtı verecek sayıda kesit paraldehide-fuchsine (PAF-Gabe) ile boyandı <sup>16</sup>. Çalışmada total beyinlere ait fotoğraflar Carl Zeiss stereomikroskopta Nikon Coolpix 4300 dijital kamera ile histolojik preparatlara ait fotoğraflar ise Olympus marka mikroskopta Nikon Coolpix 4500 dijital kamera ile çekildi.

## BULGULAR

*B. mori*'nin larval, pupal ve ergin evrelerine ait dişi ve erkek bireylerin beyinlerinden alınan ve PAF ile boyanan kesitlerin ışık mikroskobu ile değerlendirmeleri larval ve pupal evrelerin 0. ve sonuncu günleri ile ergin evrenin başlangıcı için yapıldı.

Dişi ve erkek ipekböceklerine ait beyinlerde de histolojik açıdan belirgin bir farklılık saptanmadığından, bulgular verilirken dişi-erkek ayrımı da gözletilmedi.

### Larval Evre

İpekböceği larvasının ilk üç instarından alınan kesitlerden elde edilen veriler yetersiz görüldü ve değerlendirmeye tabii tutulmadı. Dördüncü ve 5. instarlar arasında ise hücre sayıları, yerleşimleri ve büyüklükleri açısından bir farklılık saptanmayarak larval evrede 5. instar esas alındı.

Beyin yapısının iki loblu oluşumu en iyi bu evrede ayırt edildi (Şekil 1). Bir çift CC ile hemen arkasında yer alan CA'yı birbirine bağlayan oldukça kısa bir sinir uzantısı vardır. Beyinden çıkan iki adet sirkümüözofajial konnektif özofagusu sarmakta ve subözofajial ganglionla bağlanmaktadır.

Tüm sinir sistemi, bol miktarda kollajen lif içeren *neural lamella* (NL) adı verilen ve PAF ile yeşil renkte ayırt edilen bir bağ doku ile bu yapının hemen altında yer alan perineural hücrelerle örtülüdür. Larval evre boyunca PIC'te bulunan nörosekresyon hücrelerinin antero-laterallere doğru bir yay çizecek şekilde konumlandıkları görüldü. Beynin her iki lobunun merkezi, aksonlardan oluşan *neuropil* (Np) bölgesini içermektedir. Nöronlar, glial hücreler ve nörosekresyon hücreleri bu bölgenin periferine yerleşmişlerdir (Şekil 2a).

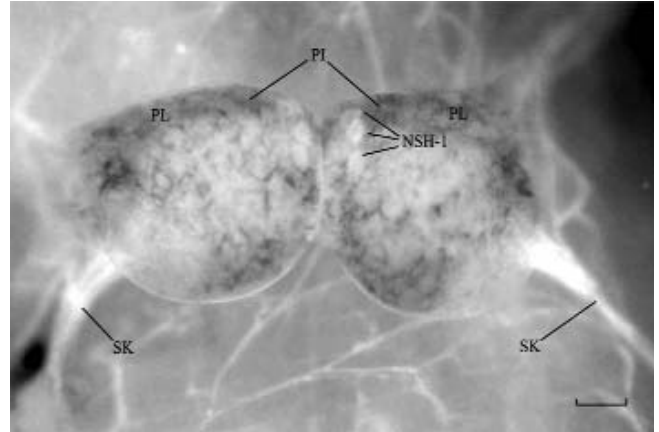
Nörosekresyon hücreleri Şekil 2b'de şematize edildiği şekilde, beyin PIC ve PL bölgelerinde iki grup halinde bulundu. PIC hücreleri, iki beyin lobunun birleştiği me-

dian hattın her iki yanında lokalize olmuşken PL hücreleri her bir lobun antero-lateraline doğru gruplaşmıştı.

Nörosekresyon hücreleri beyin her iki lobunda simetrik lokalize olmamalarına rağmen benzer boyanma özelliklerine sahip olarak ve eşit sayılarda görüldü.

NSH-1 hücreleri, PIC'in anteriorüne doğru yerleşmiştir. Küreye yakın şekilli hücrelerin nükleusu da oldukça iri ve küresele yakın olup, genelde merkezi konumdadır. Nükleus az miktarda ve dağınık heterokromatin materyali içermektedir. Nükleolus ayırt edilememiştir (Şekil 3a).

Beşinci instarın 0. gününe ait *B. mori* larvalarında, beyin orta hattının iki yanında ve dörder adet olmak üzere PAF (+) NSH-1 tipinde toplam sekiz hücre saptandı. NSH-1 hücreleri, ışığı kırma özelliklerinden dolayı canlı beyinde herhangi bir boya kullanılmadan da açık bir şekilde görülebildi (Şekil 1). Yapılan ölçümlerde ortalama boyutlarının 30-45 µm, nükleus/sitoplazma oranının ise yaklaşık 1/2 olduğu belirlendi. Bu hücrelerin bir kısmında küçük birer vakuol bulundu.

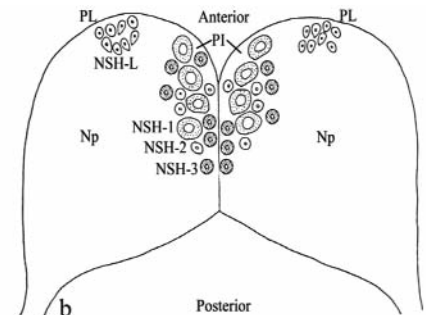
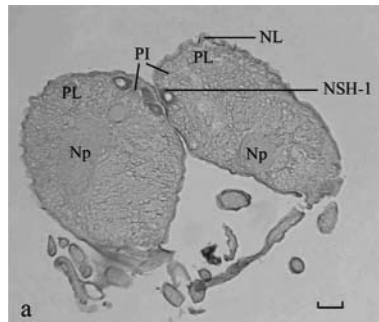


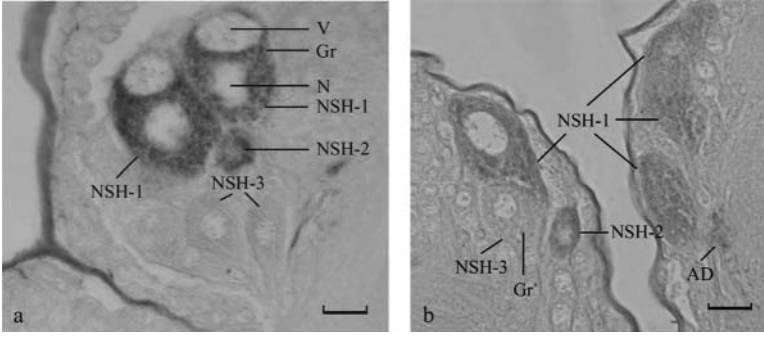
**Şekil 1.** Beşinci instar ipekböceği larvasında beyin total görünümü. NSH-1-median nörosekresyon hücreleri, PI-pars interserebralis, PL-pars lateralis, SK-sirkümüözofajial konnektif (Bar 100 µm)

**Fig 1.** Total appearance of brain at 5th instar of silkworm larvae. NSH-1-median neurosecretion cells, PI-pars intercerebralis, PL-pars lateralis, SK-circumoesophageal connective (Bar 100 µm)

**Şekil 2.** Beşinci instar ipekböceği larvasında **a.** iki loblu beyin genel görünümü, **b.** nörosekresyon hücreleri lokalizasyonlarının şematik gösterimi. NL-neural lamella, Np-nöropil, NSH-L-lateral nörosekresyon hücreleri, NSH-1, 2, 3-median nörosekresyon hücreleri, PI-pars interserebralis, PL-pars lateralis (Bar 50 µm)

**Fig 2.** At 5th instar of silkworm larvae **a.** common appearance of brain with two lobes, **b.** schematic appearance of localizations in neurosecretion cells. NL-neural lamella, Np-neuropil, NSH-L-lateral neurosecretion cells, NSH-1, 2, 3-median neurosecretion cells, PI-pars intercerebralis, PL-pars lateralis (Bar 50 µm)



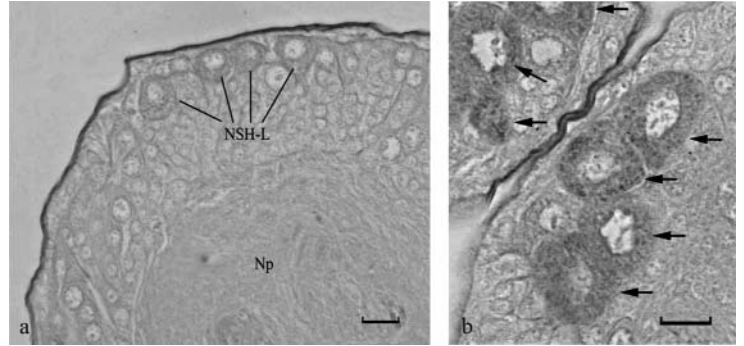


**Şekil 3. a.** NSH-1 hücrelerine ait vakuoller, **b.** PIC'teki (NSH-1-2-3) nörosekresyon hücreleri. AD-akson demeti, Gr-nörosekresyon granülü, N-nükleus, V-vakuol (Bar 20 µm)

**Fig 3. a.** Vacuoles concerning with NSH-1 cells, **b.** (NSH-1-2-3) neurosecretion cells in PIC. AD-axon bundle, Gr-neurosecretion granule, N-nucleus, V-vacuole (Bar 20 µm)

**Şekil 4. a.** PL'deki nörosekresyon hücreleri (NSH-L), **b.** 5. instarın sonuncu gününde NSH-1 hücreleri (→), Gr-nörosekresyon granülü, N-nükleus, Np-nöropil (Bar 20 µm)

**Fig 4. a.** Neurosecretion cells (NSH-L) in PL, **b.** NSH-1 cells (→) in last day of 5. instar, Gr- neurosecretion granule, N-nucleus, Np-neuropil (Bar 20 µm)



Dördüncü instarda vakuol oluşumuna rastlanmamış olması, 5. instar ile farklılık olarak belirtilecek tek özelliğdir.

PIC'te ayrıca, PAF ile (+) reaksiyon vermeyen, koyu yeşil renkte boyanmış bir diğer hücre grubu (NSH-2) görüldü. NSH-1 hücrelerinden çok daha küçük boyut-taki bu hücreler küresel olup, sitoplazmalarında koyu yeşil renkte boyanmış olan irili ufaklı granüller içermektedir. Büyük ve küresel şekilli nükleuslarının içinde dağınık halde heterokromatin ayırt edildi (*Şekil 3b*).

NSH-1 ve NSH-2 hücrelerinden başka, PIC'te zeminle aynı renkte boyanmış olan hücreler bulundu. NSH-2 hücrelerinden daha büyük çaptaki bu hücreler çalışmada NSH-3 olarak adlandırıldı (*Şekil 3b*). Küresele yakın şekilli NSH-3 hücrelerinin sitoplazmalarında granüler yapılar saptandı. İri ve merkezi konumlu nükleus içinde dağınık halde heterokromatin materyali bulundu. PL'de de, içerdikleri granüler yapılar nedeniyle nörosekresyon hücreleri oldukları düşünülen, şekil ve boyut açısından NSH-2 hücrelerine benzeyen hücreler bulundu. PAF boya metodu ile kendi aralarında sınıflandırılmayan PL hücrelerinin tümü NSH-L olarak isimlendirildi (*Şekil 4a*). Bu hücrelerin de oldukça büyük ve sferik yapıdaki nükleusları merkezi konumdadır.

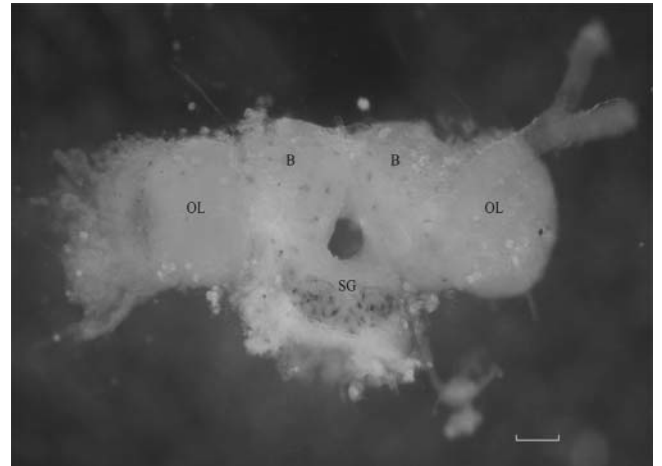
Antero-laterallerde 7-8 çift NSH-L hücreleri ayırt edildi. Bunlar da, zeminle aynı renkte olan 15-20 µm çaptaki hücrelerdir (*Şekil 4a*).

Beşinci instarın sonuncu gününde de, median bölgede dört çift NSH-1 hücreleri yer almaktadır. Pem-

be renkli sitoplazma içinde nörosekresyon materyali az miktardadır (*Şekil 4b*). Bu hücrelerde bulunan vakuoller, 5. instarın 0. gününde saptanmış olanlara göre daha büyüktürler. Burada bir çift NSH-2 hücresi görülebildi. Median bölgede çok az sayıda (2-3 çift) NSH-3 hücresi tespit edildi. PL'de az sayıda (3-4 çift) NSH-L hücresi yer almaktadır.

### Pupal Evre

Pupada beyin dorso-ventral yönde yassılaşmakta ve büyümektedir (*Şekil 5*). Optik loblar ilk olarak bu evrede ayırt edilmeye başlandı. CC ve CA giderek anteriore ve beyine doğru yaklaşmakta, subözofajial



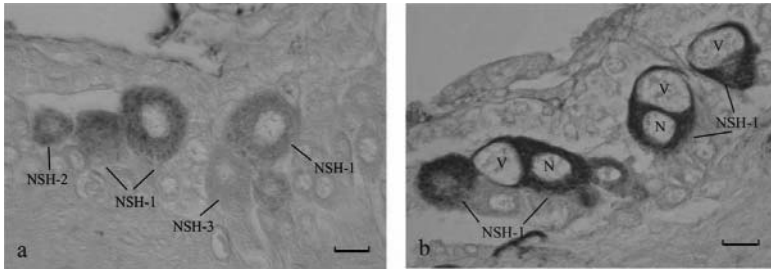
**Şekil 5.** Pupanın 6. gününde beyin total görünümü. B-beyin lobu, OL-optik lob, SG-subözofajial ganglion (Bar 200 µm)

**Fig 5.** Total appearance of brain at day 6 of pupae. B-lobe of brain, OL-optic lobe, SG-subesophageal ganglion (Bar 200 µm)

ganglion ile beyin arasındaki mesafe de giderek azalmaktadır.

Pupal evrenin 0. gününde hücrelerin yerleşimleri larval evredesine çok benzemektedir. PIC'teki hücreler pupal evrenin 0. gününde de median bölgede antero-laterallere doğru bir yay çizecek şekilde yerleşmiştir. Bu hücrelerin pupanın 6 ve 11. günlerindeki yerleşimi ise, antero-medianda düz bir hat üzerindedir (Şekil 6a).

Saptanan hücre tipi ile sayıları ve boyutları bakımından pupal evre boyunca bir değişiklik izlenmedi.

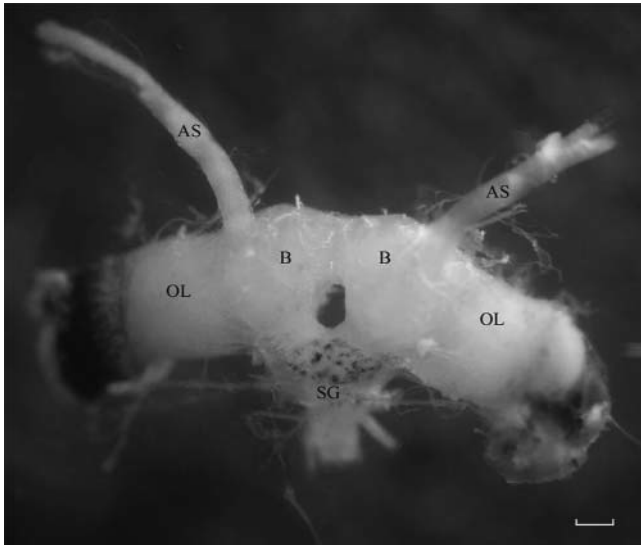


Bu evrede NSH-1 hücrelerinin vakuolleri, bazen nukleustan daha fazla bir alanı kaplayacak büyüklükte dirler (Şekil 6b). Median bölgede dört çift NSH-2 hücresi mevcuttur. Pupal evrede aynı bölgede 5-6 çift NSH-3 hücresi tespit edildi, ancak pupanın 11. gününden itibaren bu hücrelerin granül içeriği oldukça azalmış durumdadır.

Pupal evre süresince antero-lateral bölgede açık ya da koyu boyanmış nörosekresyon hücresi görülmedi.

### Ergin Evre

Ergin ipekböceklerinde beyin görünümü larval



Şekil 7. Ergin ipekböceğinde beyin total görünümü. AS-antennal sinir, B-beyin lobu, OL-optik lob, SG-subesofajial ganglion (Bar 200 µm)

Fig 7. Total appearance of brain in moth. AS-antennal nervous, B-lobe of brain, OL-optic lobe, SG- subesophageal ganglion (Bar 200 µm)

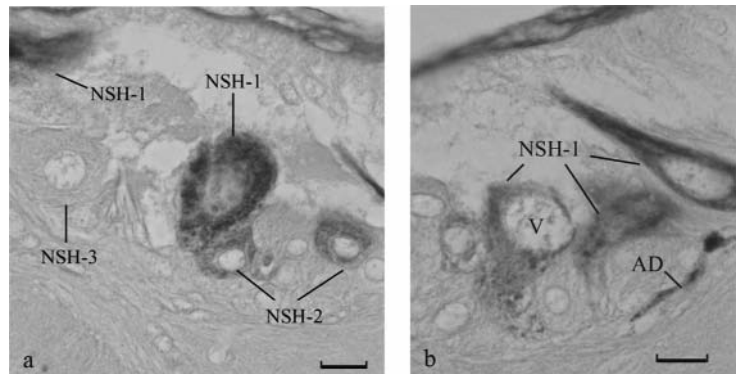
evredekinden çok farklıdır. Beyin oldukça yassılaştırılmış ve enine büyümüştür. CC ve CA artık beyine çok yakın konumdadır. Pupal evre süresince anteriore doğru ilerleyen subzöfajial ganglion ile beyin posterior kısmı neredeyse kaynaşmış, arada sadece özofagus ve aortanın geçmesine izin veren bir kanal kalmıştır (Şekil 7).

Median bölgede yer alan NSH-2 hücreleri, bu evreye ait farklı örneklerin sadece bazılarında bulundu. Daha önceki evrelerle karşılaştırıldığında mavimsi renkte boyanmış olan bu hücrelerin ortalama 15-20 µm çapa sahip oldukları belirlendi (Şekil 8a). Ayırt edilen 5-6 çift NSH-3 hücresinin de çok az miktarda granül içerdiği saptandı.

Bu evrede median bölgede yer alan nörosekresyon hücreleri, anteriorde düz bir hat üzerinde toplanmış olarak görüldü. Larval evreden ergin evreye kadar olan gelişim sürecinde beyin hacmi giderek artmış, ancak nörosekresyon hücrelerinin boyutlarında

Şekil 8. Ergin beyinde a. nörosekresyon hücreleri (NSH-1-2-3), b. nörosekresyon materyalini kaybetmiş NSH-1 hücreleri, AD-akson demeti, V-vakuol (Bar 20 µm)

Fig 8. In moth brain a. neurosecretion cells (NSH-1-2-3), b. NSH-1 cells losed neurosecretion material, AD-axon bundle, V-vacuole (Bar 20 µm)



önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Hücre şekilleri açısından ise farklılıklar vardır. Ergin beyinde NSH-1 hücrelerinin bir kısmının, bazı bölgelerinde nukleus ile hücre zarı arasında çok az miktarda sitoplazmik alan kalacak şekilde uzayıp inceldikleri ve nörosekresyon materyallerini büyük oranda kaybettikleri görüldü (Şekil 8b).

PL'de bulunan NSH-L hücreleri, granüllerinin son derece azalmış olması nedeniyle güçlükle ayırt edilebilir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Böceklerde metamorfoz, morfolojik ve fizyolojik özelliklerde meydana gelen bir takım köklü değişimleri kapsamaktadır. İpekböceği beyinde anatomik değişimler, beyin hacim olarak büyüyüp gittikçe yassılaşması ve posteriorunda yer alan subözofajial ganglion ile birleşmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Histolojik açıdan meydana gelen değişiklikler ise, PAF yöntemi ile gösterilmiştir.

Ichikawa, 5. instar ipekböceği larvasının beyindeki nörosekresyon hücrelerinin PIC ve PL iki grup halinde bulduklarını belirtmiştir<sup>20</sup>. Bu çalışmada ise larva, pupa ve erginde PAF ile verdikleri reaksiyona göre PIC bölgesinde NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 olarak adlandırılan üç tip hücre tanımlandı. PL'de yer alan hücrelerde bu boyaya karşı bir afinite bulunmaması nedeniyle, böyle bir ayırım yapılamadı ve bu bölgede yer alan tüm nörosekresyon hücreleri NSH-L olarak isimlendirildi.

PIC'in NSH-1 hücreleri, nörosekresyon granülleriyle 5. instarın sonuncu gününde net biçimde ayırt edildi. Ortalama 30-45 µm'luk çapları ile ipekböceği beyindeki bu en büyük hücreler, tüm gelişim evrelerinde 4 çift olarak bulundu. NSH-1 hücreleri, yerleşimleri, beyindeki en büyük hücre oluşları ve sayıları bakımından Panov'un lepidopterlerde belirlediği A' hücrelerine uygunluk gösterdi. Panov, üzerinde çalıştığı 54 lepidopter türünün hemen hepsinde bu hücrelerden 4 çift bulunduğunu belirtmektedir<sup>6</sup>. Akai ve ark., *B. mori* beyininin median bölgesinde A ve B olmak üzere iki tip hücre tanımlamakta ve sitoplazmalarında büyük birer vakuole sahip olabilen bu hücreleri A-hücresi olarak isimlendirmişlerdir<sup>25</sup>. Ichikawa ise 5. instar *B. mori* larvalarının PIC'inde bulunan nörosekresyon hücrelerini, fluoresans bir boya olan lusifer sarısının hücre içine enjeksiyonu yöntemini kullanarak sınıflandırmıştır. Bu bölgedeki hücreleri,

hücre gövdelerinin yerleşimi ve akson uçlarının sonlandığı bölgeleri dikkate alarak, M1, M2 ve M3 olmak üzere 3 gruba ayırmış ve M1 grubunun da kendi içinde en az beş alt gruba ayırdığını bildirmiştir<sup>20</sup>. Bunlardan M1a hücrelerinin yapısal görünüşü çalışmamızdaki NSH-1 hücreleri ile uygunluk gösterdi.

Bombiksin; insülin benzeri bir peptid olup, ilk kez *B. mori* beyinden izole edilmiş ve önceleri 4K-PTTH olarak adlandırılmıştır. Mizoguchi ve ark., *B. mori*'nin erginleri üzerinde bombiksin'in etkisinin kesin olarak bilinmediğini işaret ederlerken<sup>28</sup>, Satake ve ark ise larval evrede şeker metabolizması<sup>29</sup> ile ilişkili olduğunu belirtmektedirler. Mizoguchi ve ark., immünohistokimyasal çalışmalarında bombiksinin A-hücrelerince sentezlendiğini bildirmişlerdir<sup>24</sup>. Bunlar, çalışmamızda NSH-1 olarak adlandırılan dört çift hücreye karşılık gelmektedir. Akai ve ark., büyük bir sitoplazmik vakuol ile karakterize edilen aynı grup hücrelerde immünreaktif materyalin yalnızca sitoplazmada bulunduğunu, agranüler endoplazmik retikulum tarafından sarılmış olan vakuolün ise bombiksin içermediğini ifade etmişlerdir<sup>25</sup>. Bu çalışmada, vakuollerin 5. instardan itibaren görülmeye başladığı ve pupal evre süresince de gittikçe büyüdüğü belirlendi.

Parlak ve Ünal, 5. larval evre süresince hemolenf ekdisteroid değişmelerine bağlı olarak, PAF (+) hücrelerin boyanma özelliklerinde farklılıklar olduğunu işaret etmişler. Aynı çalışmada bu hücrelerin 5. instarın 7. gününden itibaren salgı yoğunluğunu kaybettikleri de belirtilmektedir<sup>30</sup>. Bu durum NSH-1 hücrelerinin 5. instarın sonuncu gününde, 0. güne göre çok daha açık renkte boyanmış olması yönündeki bulgumuzu desteklemektedir. Yani NSH-1 hücreleri tarafından sentezlenen nörosekresyon materyali kritik bir salınma periyoduna sahip olup, 5. larval evrenin sonlanmasına yakın bir zamanda hemolenfe veriliyor olmalıdır. Dördüncü instarın 0. ve sonuncu günleri arasında da bu şekilde bir boyanma farklılığı gözlenmiş olması, Parlak ve Ünal'ın çalışması ile uyumludur. Dördüncü ve 5. instarların 0. günlerinde koyu bir boyanma elde edilmesi ise, deri değişimi aşamasında nörosekresyon materyalinin tekrar sentezlenmeye başladığını düşündürmektedir. Mizoguchi ve ark.'larının immünohistokimyasal yolla 5. instarın 0. ve 1. günlerinde bu hücrelerde bombiksin bulunduğunu göstermeleri<sup>24</sup>, bu düşüncüyü kuvvetlendirmektedir.

Ergin ipekböceği beyindeki bombiksin düzeyi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamış olmakla birlikte, kesitlerde bazı NSH-1 hücrelerinin uzayıp incelmış

şekilde görülmelerinin nedeninin, görevi biten bu hücrelerin sentez aktivitelerini kaybetmeleri sonucu granül içeriklerinin ve dolayısıyla sitoplazmik alanlarının azalması olduğu düşünülmektedir.

Beyinde bulunan tüm NSH-1 hücrelerinin aynı yoğunlukta boyanmamaları tüm NSH-1 hücrelerinin aynı anda eşit miktarda nörosekresyon materyali içermediğini ima etmektedir. Yani her bir hücrenin salgı üretimi, katılacağı olaylara bağlı olarak kendine özgü bir aktivasyon döngüsüne sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada NSH-2 olarak adlandırılan hücreler, yerleşim ve sayı bakımından Panov'un lepidopterlerde A" olarak adlandırdığı hücrelere karşılık gelmektedir<sup>6</sup>. NSH-2 hücreleri, NSH-1 hücrelerine çok yakın yerleşime sahip olup, bu hücrelerle birlikte Ichikawa'nın M1 olarak isimlendirdiği gruba dahildirler<sup>20</sup>. Dördüncü instarın 0. gününde dört çift NSH-2 hücresi görülmekteyken, sonuncu güne ait preparatlarda sadece bir çifti ayırt edilebildi. Bu hücrelerin pupal evrede yine 4 çift olarak bulunması, 5. instarın son günü için bir dejenerasyondan ziyade, nörosekresyon materyalinin kaybı ya da kimyasal yapısındaki bir değişim sonucu boyanma özelliklerinin değiştiğini düşündürmektedir. Ayrıca NSH-2 hücrelerinin diğer evrelerden farklı olarak erginde mavimsi renkte görülmesinin nedeni de, bu hücrelerin farklı gelişim evrelerinde farklı tipte nörosekresyon materyali sentezlemeleri olabilir.

PAF ile reaksiyon vermeyen NSH-3 hücrelerinin sitoplazmalarında ayırt edilebilen granüler yapılar, onların farklı içeriğe sahip nörosekresyon hücreleri olduklarını düşündürmektedir. Bunlar median hattın her iki yanında beyin anterioru ile posterioru arasında dizilmişlerdir. Ichikawa'nın araştırmasında<sup>20</sup> M1 olarak isimlendirilen hücrelerin bir kısmı ile M2 ve M3 gruplarına dahil hücrelerin tamamı bu çalışmada NSH-3 olarak adlandırılmış, ancak büyüklük ve yerleşim açısından kendi içinde heterojen bir grup oluşturan NSH-3 hücrelerinin daha ileri derecede sınıflandırılmaları mümkün olmamıştır.

PIC'te yer alan hücreler larval evre boyunca ve pupanın 0. gününde median hattın her iki yanında antero-laterallere doğru bir yay çizecek şekilde yerleşmişlerdir. Pupanın 6 ve 11. günleri ile erginde anteriorde düz bir hat üzerinde yerleşmiş şekilde görüldüler. Bunun nedeninin, NSH-1 ve NSH-2 hücreleri ile birlikte, özellikle median hat üzerinde beyin anterioru ile posterioru arasında dizilmiş olan NSH-3 hücrelerinin pupal evre süresince anteriore doğru ilerlemesi olduğu düşünülmektedir. Yani gelişim sırasında nö-

rosekresyon hücrelerinin lokalizasyonları değişmektedir.

NSH-L hücreleri, beyin her iki lobunun antero-lateral bölgelerinde birer grup oluşturmaktadır. Bu hücreler de içerdikleri sitoplazmik granüller ile çevrelerinde bulunan diğer hücrelerden ayrılmaktadırlar. Mizoguchi ve ark., 5. instar *B. mori* larvasında immünohistokimyasal yolla, ekdizon salgılamak üzere prothoracik bezi uyaran bir hormon olan prothoracicotropic hormone (PTTH)'un iki çift lateral nörosekresyon hücresi tarafından sentezlendiğini göstermişlerdir<sup>14</sup>.

İpekböceği *B. mori* üzerinde yapılan bu çalışmanın, diğer araştırmacılar tarafından elde edilen verilerle karşılaştırılması sonucunda, farklı isimlendirmelerle ele alınmış olsa da, nörosekresyon hücrelerinin lokalizasyonları ve boyanma özellikleri açısından benzerlikleri ortaya koyduğu görülmektedir<sup>20,24,25,30</sup>. Gelişim sürecinde beyin nörosekresyon hücrelerinin bu özelliklerinde bir takım değişikliklerin meydana gelmesi ile boyanma düzeyindeki farklılıkların, sentezlenen nörosekresyon materyalinin gereksinimlere göre artması ya da azalmasına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir.

NSH-1 hücrelerinde görülen vakuoller ile ilgili olarak ise; bunların gelişim evrelerine bağlı oluşumlar olduğu muhtemelen üretilen bir takım maddelerin işleminde biriktirildiği ve onların verilışı ile boşlukların kaldığı düşüncesi dışında net bir görüş bildirilememektedir.

## KAYNAKLAR

- 1. Parlak O:** İpekböceği Biyolojisi Yardımcı Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Basımevi, Fen Fakültesi Yayınları, No. 171, İzmir, 2001.
- 2. Chapman RF:** The Insects, Structure and Function. First ed. The English Universities Press LTD, 1969.
- 3. Geldiay S, Karaçalı S:** The neurosecretory system of the adult *Melanogryllus desertus* Pall. (Orthoptera, Gryllidae) II. Cerebral neurohemal area. *Cell Tissue Res*, 211, 235-240, 1980.
- 4. Geldiay S, Edwards JS:** The protocerebral neurosecretory system and associated cerebral neurohemal area of *Acheta domesticus*. *Z Zellforsch*, 145, 1-22, 1973.
- 5. Mutun S, Öber A:** The localization and structure of a neurohemal H-organ in *Acrida bicolor* (Thunberg) and *Locusta migratoria* (Linnaeus) (Orthoptera). *Turk J Zool*, 22, 41-44, 1998.
- 6. Panov AA:** The median neurosecretory cells in the brain of Lepidoptera (Insecta). *Zool Anz Jena*, 210, 180-203, 1983.
- 7. Lococo DJ, Tobe SS:** Neuroanatomy of the retrocerebral complex, in particular the pars intercerebralis and partes laterales in the cockroach *Diploptera punctata* Eschscholtz (Dictyoptera: Blaberidae). *Int J Insect Morphol Embryol*, 13, 65-76, 1984.

- 8. Shiga S:** Anatomy and functions of brain neurosecretory cells in Diptera. *Microsc Res Techniq*, 62, 114-131, 2003.
- 9. Bowen MF, Bollenbacher WE, Gilbert, LI:** In vitro studies on the role of the brain and prothoracic glands in the pupal diapause of *Manduca sexta*. *J Exp Biol*, 108, 9-24, 1984.
- 10. Shiga S, Davis NT, Hildebrand JG:** Role of neurosecretory cells in the photoperiodic induction of pupal diapause of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *J Comp Neurol*, 462, 275-285, 2003.
- 11. Veenstra JA, Hagedorn HH:** Identification of neuroendocrine cells producing a diuretic hormone in the tobacco hornworm moth, *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res*, 266, 359-364, 1991.
- 12. Yamanaka A, Endo K, Nishida H, Kawamura N, Hatase Y, Kong W, Kataoka H, Suzuki A:** Extraction and partial characterization of pupal-cuticle-melanizing hormone (PCMH) in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. (Lepidoptera, Papilionidae). *Zool Sci*, 16, 261-268, 1999.
- 13. Orikasa C, Yamauchi H, Nagasawa H, Suzuki A, Nagata M:** Induction of oocyte-nurse cell differentiation in the ovary by the brain during the initial stage of oogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl Entomol Zool*, 28 (3): 303-311, 1993.
- 14. Mizoguchi A, Tadanori O, Kataoka H, Nagasawa H, Suzuki A, Ishizaki H:** Immunohistochemical localization of prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the brain of *Bombyx mori*. *Dev Growth Differ*, 32 (6): 591-598, 1990.
- 15. Sakakibara M, Fugo H:** *In vitro* eclosion hormone synthesis and secretion in the brain-retrocerebral complexes of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 36 (7): 489-493, 1990.
- 16. Geldiay S:** Neurosecretory cells in ganglia of the roach. *Blaberus craniifer*. *Biol Bull*, 117, 267-274, 1959.
- 17. Bullock TH, Horridge GA:** Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates. W.H. Freeman and Co., San Francisco and London, 1965.
- 18. Copenhaver PF, Truman JW:** Metamorphosis of the cerebral neuroendocrine system in the moth *Manduca sexta*. *J Comp Neurol*, 249, 186-204, 1986.
- 19. Öber A:** Zoolojide Laboratuvar Teknikleri (Ders Kitabı), 2. baskı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, 2004.
- 20. Ichikawa T:** Architecture of cerebral neurosecretory cell systems in the silkworm *Bombyx mori*. *J Exp Biol*, 161, 217-237, 1991.
- 21. Carrow GM, Calabrese RL, Williams CM:** Architecture and physiology of insect cerebral neurosecretory cells. *J Neurosci*, 4 (4): 1034-1044, 1984.
- 22. Nijhout HF:** Axonal pathways in the brain-retrocerebral complex of *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). *Int J Insect Morphol Embryol*, 4 (6): 529-538, 1975.
- 23. Morohoshi S, Oshiki T, Kikuchi I:** The control of growth and development in *Bombyx mori*. XXXIX. Axonal pathways between the cerebral neurosecretory cells and retrocerebral complex in *Bombyx mori*. *Proc Japan Acad, Ser. B*, 80, 53, 199-203, 1977.
- 24. Mizoguchi A, Ishizaki H, Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Fujino M, Kitada C:** A monoclonal antibody against a synthetic fragment of bombyxin (4K-prothoracicotropic hormone) from the silkworm, *Bombyx mori*: Characterization and immunohistochemistry. *Mol Cell Endocrinol*, 51, 227-235, 1987.
- 25. Akai H, Nagashima T, Aoyagi S, Endo Y, Uwo MF, Asaoka K, Kataoka H, Suzuki A, Kobayashi E:** Development and secretory function of neurosecretory A cell in brain of *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem*, 32, 333-340, 1996.
- 26. Turgay İzzetoğlu G, Falakalı Mutaf B:** İpekböceği (Bombycidae: *Bombyx mori*)'nin farklı genomik içerikli yumurtalarında vitellin proteini özelliklerinin araştırılması. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 1 (1): 23-29, 2008.
- 27. Turgay İzzetoğlu G, Özkorkmaz F, Zeka Ö, Öber A:** İpekböceği (Bombycidae: *Bombyx mori*)'nde juvenil ve ekdizon hormonları uygulaması sonucu olası değişimler. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (4): 525-530, 2009.
- 28. Mizoguchi A, Hatta M, Sato S, Nagasawa H, Suzuki A, Ishizaki H:** Developmental change of bombyxin content in the brain of the silkworm *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 36 (9): 655-664, 1990.
- 29. Satake S, Nagata K, Kataoka H, Mizoguchi A:** Bombyxin secretion in the adult silkworm *Bombyx mori*: Sex-specificity and its correlation with metabolism. *J Insect Physiol*, 45, 939-945, 1999.
- 30. Parlak O, Ünal G:** İpekböceği *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) beyin neurosekresyon hücrelerinde 5. larval evre süresince hemolenf ekdisteroid değişmelerine bağlı farklılıkların araştırılması. *Turk J Zool*, 23, 733-737, 1999.