**T.C.**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# EDİRNE İLİ'NDE BULUNAN DİŞİ *Rhipicephalus sanguineus* kompleks (ACARI: IXODIDAE) KENELERİNİN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

**HATİCE SOYLU**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. ECE ŞEN**

**EDİRNE-2019**

HATİCE SOYLU'nun hazırladığı "EDİRNE İLİ'NDE BULUNAN DİŞİ *Rhipicephalus sanguineus* kompleks (ACARI: IXODIDAE) KENELERİNİN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

| Jüri Üyeleri: | İmza |
|---|---|
| Prof. Dr. Ece Şen | ..... |
| Prof. Dr. Ayşe Mine Küçüker | ..... |
| Prof. Dr. Ayşegül Topal Sarıkaya | ..... |
| Doç. Dr. Mehmet Aybeke | ..... |
| Doç. Dr. Mesut Boz | ..... |

Tez Savunma Tarihi: 22/02/2019

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Ece Şen
Tez Danışmanı

.....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Murat Yurtcan
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI**
**DOĞRULUK BEYANI**

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

22/02/2019
Hatice Soylu



Doktora Tezi
Edirne İli'nde Bulunan Dişi *Rhipicephalus sanguineus* kompleks (Acari: Ixodidae) Kenelerinin Bazı Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

# ÖZET

Yeryüzünde tanımlanan ve sistematikteki yeri belirlenen canlıların %80'den fazlasını teşkil eden arthropodlar en önemli vektörlerdir. Medikal ve veteriner öneme sahip arthropodlar; kan emerek, toksisiteye neden olarak konaklarına zarar verebildiği gibi; aynı zamanda bakteriyel, viral, paraziter, spiroketal ve riketsiyal birçok hastalığı insan ve hayvanlara nakletmektedir. Ülkemiz Arthropoda şubesinde yer alan kenelerin yaşamaları için uygun koşullara sahiptir. Bu çalışmada, Edirne İli'ndeki dişi *Rhipicephalus sanguineus* kene ekstraktlarının biyolojik aktiviteleri ilk kez araştırılmıştır. Çalışmamızda, Edirne İli'ndeki sert keneler örneklenmiş; teşhisleri yapılmış; kene ekstraktları hazırlanmış ve bunların olası mutajenik etkisi Ames testi ile; olası antimikrobiyal etkisi disk difüzyon testi ile; HeLa (insan servikal adenokarsinoma) ve MEF [Mouse embryonic fibroblast (fare embriyonik fibroblast)] hücre hatlarına olası apoptotik etkileri Annexin-V testi ile; HeLa ve MEF hücre hatlarına olası antiproliferatif etkileri MTT testi ile; HeLa ve MEF hücre hatlarının migrasyonuna olası etkileri Boyden Chamber testi ile incelenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada kene ekstraktlarının hücre hatlarında apoptotik ve antiproliferatif etkisi gözlemlenmiştir.

Yıl : 2019
Sayfa Sayısı : 84
Anahtar Kelimeler : Edirne, ixodidae, kene, *Rhipicephalus sanguineus*, apoptoz

Doctoral Thesis
Investigation of Some Biological Activities of Female *Rhipicephalus sanguineus* complex (Acari: Ixodidae) Ticks in Edirne Province
Trakya University Institute of Natural Sciences
Biology

# ABSTRACT

Arthropods are the most important vectors that constitute more than 80% of living species that are identified and taxonomized on Earth. Arthropods which have medical and veterinary importance; may damage their hosts by sucking blood, causing toxicity; and also transmit various bacterial, viral, parasitic, spirochetal and rickettsial diseases to human and animals. Our country has suitable conditions for survival of ticks of the phylum Arthropoda. In this study, we seeked biological activities of extracts of female ticks of *Rhipicephalus sanguineus* that are found in Edirne Province first time. Our study included the following work flow: sampling and identification of ticks in Edirne Province, preparation of tick extracts, examination of possible mutagenic effects of them by Ames test, examination of possible antimicrobial effects by disc diffusion test; examination of possible apoptotic effects on HeLa (human cervical adenocarcinoma) and MEF (Mouse embryonic fibroblast) cell lines by Annexin-V test, examination of possible antiproliferative effects on HeLa ve MEF cell lines by MTT test and examination of possible effects on migration of HeLa ve MEF cell lines. As a result, apoptotic and antiproliferative effects of tick extracts on tissue cell lines were observed in this study.

Year : 2019
Number of Pages : 84
Keywords : Edirne, ixodidae, tick, *Rhipicephalus sanguineus*, apoptosis

# ÖNSÖZ

Doktora programı boyunca kıymetli bilgi, tecrübe ve desteği ile rehberlik eden danışman hocam Prof. Dr. Ece ŞEN'e (Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD),

Tez çalışmasının her döneminde değerli katkı, ilgi ve yönlendirmeleri için, Tez izleme komitesindeki hocalarım Doç. Dr. Mehmet AYBEKE (Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik ABD) ve Doç. Dr. Mesut BOZ'a (Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya ABD),

Her daim değerli laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşan çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Deniz AKSOY'a ve Araş. Gör. Gazel Burcu AYDIN'a,

Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ndeki kıymetli öğretim elemanlarına,

Sevgi, emek ve fedakarlıkları için ailem ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) biriminin maddi desteğiyle gerçekleştirilmiştir (TÜBAP- 2014-101).

# İÇİNDEKİLER

**ÖZET……..……..i**
**ABSTRACT…….……ii**
**ÖNSÖZ……..……..iii**
**İÇİNDEKİLER…….……..iv**
**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……...……..vi**
**ÇİZELGELER DİZİNİ……...……viii**
**ŞEKİLLER DİZİNİ…….……x**
**BÖLÜM 1- GİRİŞ……..……..1**
**BÖLÜM 2- GENEL BİLGİLER……4**
2.1. Kenelerin Genel Özellikleri…….……4
2.2. Çalışmada Kullanılan Kene, Bakteri ve Hücre Hatları……..……16
**BÖLÜM 3- MATERYAL VE METOD……...…….23**
3.1. Kenelerin Örneklenmesi ve Saklanması……..……..23
3.2. Kenelerin Teşhisi…….…….23
3.3. Kene Ekstraktlarının Testler İçin Hazırlanması……..…….. 24
3.4. Hücre kültürleri……..…….. 25
3.4.1. MTT (Metil Tiyazol Tetrazolyum) Testi……...…….25
3.4.2. Boyden Chamber Testi……..…….26
3.4.3. Annexin V Testi……...…..28
3.5. Ames Testi……30
3.6. Disk Difüzyon Testi……..……35
**BÖLÜM 4- SONUÇLAR……..…….37**
4.1. Kenelerin Örneklenmesi ve Dağılımları……...…….37
4.2. Hücre kültürlerine *R. sanguineus* kene ekstraktlarının etkileri …….41
4.2.1. MTT (Metil Tiyazol Tetrazolyum) Testi……...…….41
4.2.2. Boyden Chamber Testi……...…50
4.2.3. Annexin V Testi……..…52

4.3. Ames Testi……58
**BÖLÜM 5-TARTIŞMA……...…….60**
**KAYNAKLAR…….…..70**
**ÖZGEÇMİŞ…….……..83**
**TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER…...…..84**

# SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**mg** : mikrogram
**µm** : mikrometre
**µl** : mikrolitre
**°C** : santigrat derece
**%** : yüzde
**ATCC** : Amerikan Tipi Kültür Kolleksiyonu
**cm** : santimetre
**dk** : dakika
**DMEM** : Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri
**DMSO** : Dimetil sülfoksit
**DNA** : Deoksiribonükleik asit
**FBS** : Fetal bovin serumu
**HB** : Histidin/biyotin
**HBA** : Histidin/biyotin/ampisilin
**IC50** : yarı öldürücü doz
**kob** : koloni oluşturan birim
**LPS** : Lipopolisakkarit
**MGA** : Minimal glukoz agar
**mg** : miligram
**ml** : mililitre
**mm** : milimetre
**mM** : milimolar
**MTT** : 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür
**NA** : Nutrient agar
**NB** : Nutrient broth
**NPD** : 4-Nitro-*o*-fenilendiamin
**OD** : Optikal densite (Optik yoğunluk)

**PBS** **:** Fosfat tampon tuzu

**PI** **:** Propidyum iyodür

**rpm** **:** dakikadaki devir sayısı

**sn** **:** saniye

**SPSS** **:** Statistical Package for the Social Sciences

**UV** **:** Ultraviyole

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Çizelge 2.1**. Kene cinslerine ait ortalama tür sayıları……..……... 5

**Çizelge 2.2.** İnsanları sıklıkla enfeste eden kene türleri, coğrafi dağılımları ve taşıdıkları patojenler……..…...…….. 13,14

**Çizelge 2.3.** Türkiye'de tespit edilen kene cinsleri ve türleri……15

**Çizelge 3.1.** *S. typhimurium* TA98 suşunun genetik özellikleri……31

**Çizelge 4.1.** Kenelerin örneklenmesi çalışmasındaki çalışma istasyonları, kene enfestasyonu yönünden muayene edilen hayvanlar ve örneklenen kenelerin türü/cinsi, cinsiyeti, gelişim evresi, sayısı…….……...…37,38

**Çizelge 4.2.** HeLa hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve HeLa hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki MTT testi absorbans sonuçlarına göre ortalama canlılık oranı (%) ve standart sapma değerleri……..…….42

**Çizelge 4.3**. HeLa hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve HeLa hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki MTT testi absorbans sonuçlarına göre ortalama canlılık oranı (%) ve standart sapma değerleri……...……44

**Çizelge 4.4.** MEF hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve MEF hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki MTT testi absorbans sonuçlarına göre ortalama canlılık oranı (%) ve standart sapma değerleri……..……..…46

**Çizelge 4.5.** MEF hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve MEF hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki MTT testi absorbans sonuçlarına göre ortalama canlılık oranı (%) ve standart sapma değerleri……...……48

**Çizelge 4.6**. MEF hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve MEF hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında, Boyden Chamber testi absorbans sonuçlarına göre ortalama migrasyon oranı (%) ve standart sapma değerleri……...…50

**Çizelge 4.7.** HeLa hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve HeLa hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında, Boyden Chamber testi absorbans sonuçlarına göre ortalama migrasyon oranı (%) ve standart sapma değerleri……...……...…….51

**Çizelge 4.8.** *R. sanguineus* kenelerine ait ekstrakt konsantrasyonlarının (IC50 ve IC50/2) HeLa hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testindeki analiz sonuçları……...……54

**Çizelge 4.9.** *R. sanguineus* kenelerine ait ekstrakt konsantrasyonlarının (IC50 ve IC50/2) MEF hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testindeki analiz sonuçları……...……57

**Çizelge 4.10.** *S. typhimurium* TA98 suşunun kullanıldığı Ames testinde *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının mutajenik etki sonuçlarına göre ortalama $his^+$ revertant koloni sayıları ve standart sapma değerleri……..58

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 2.1.** Ixodidae familyasına ait kenelerde baş (kapitulum) yapısında gözlemlenen palp, hipostom, keliser, basis capituli ve digit yapıları……...……7

**Şekil 2.2.** Ixodidae familyasına ait erkek ve dişi kenelerin dorsal ve ventral morfolojik karakterleri…….……9

**Şekil 2.3.** *R. sanguineus* yaşam evreleri……...……10

**Şekil 2.4.** *R. sanguineus* yaşam döngüsü……..……12

**Şekil 2.5.** *R. sanguineus*……16

**Şekil 2.6.** *R. sanguineus*……17

**Şekil 2.7.** HeLa (insan servikal adenokarsinoma) hücre hattı (ATCC CCL-2)……...…..18

**Şekil 2.8.** MEF [Mouse embryonic fibroblast (fare embriyonik fibroblast)] hücrelerinin doku kültürü kabındaki bir görüntüsü……..… 19

**Şekil 3.1.** Kenelerin örneklenmesi çalışmasındaki çalışma istasyonları……...…24

**Şekil 3.2.** Boyden chamber testi…….……..28

**Şekil 3.3.** Annexin V testi……...…….29

**Şekil 3.4.** Standart plak inkorporasyon testi…….……35

**Şekil 4.1.** Örneklenen *R. sanguineus* kenelerine ait fotoğraflar…….....……..39

**Şekil 4.2.** Örneklenen *Hyalomma* sp. cinsine ait fotoğraflar……39

**Şekil 4.3.** Örneklenen *Hyalomma* sp. cinsine ait fotoğraflar……..…….40

**Şekil 4.4.** Örneklenen *Hyalomma* sp. cinsine ait fotoğraflar……40

**Şekil 4.5.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen MTT testi absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılık grafiği…….……41

**Şekil 4.6.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının HeLa hücre hattı canlılığı üzerindeki 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen MTT testi absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılık grafiği…….……43

**Şekil 4.7.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının MEF hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen MTT testi absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılık grafiği……...…….…….45

**Şekil 4.8.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının MEF hücrelerinin canlılığı üzerindeki 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen MTT testi absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılık grafiği…….……47

**Şekil 4.9.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının MEF hücrelerinin migrasyonu üzerindeki 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen Boyden Chamber testi absorbans sonuçlarına göre % hücre migrasyon grafiği……50

**Şekil 4.10.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının HeLa hücrelerinin migrasyonu üzerindeki 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen Boyden Chamber testi absorbans sonuçlarına göre % hücre migrasyon grafiği…….……51

**Şekil 4.11.** *R. sanguineus* kenelerine ait IC50 konsantrasyonundaki ekstraktların HeLa hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş HeLa hücrelerinden bir görüntü…….……...….52

**Şekil 4.12.** *R. sanguineus* kenelerine ait IC50/2 konsantrasyonundaki ekstraktların HeLa hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş HeLa hücrelerinden bir görüntü…….……...…….53

**Şekil 4.13.** *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların HeLa hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş HeLa hücrelerinin kontrol grubundan bir görüntüsü……...……..54

**Şekil 4.14.** *R. sanguineus* kenelerine ait IC50 konsantrasyonundaki ekstraktların MEF hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş MEF hücrelerinden bir görüntü…….……55

**Şekil 4.15.** *R. sanguineus* kenelerine ait IC50/2 konsantrasyonundaki ekstraktların MEF hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V yöntemi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş MEF hücrelerinden bir görüntü..……..…….56

**Şekil 4.16.** *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların MEF hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş MEF hücrelerinin kontrol grubundan bir görüntüsü …….57

# BÖLÜM 1

# GİRİŞ

Keneler, konaklarından kan emerek beslenen, çeşitli biyolojik etkileri olan arthropod vektörlerdir. Ağız kısımları deriye sokulduğunda lezyonlar; konak derisinde yerleştikleri bölgede, ülser, dermatit, papüllü ve püstüllü erüpsiyonlar; deri ve deri altında meydana gelen ödemin yayılması ile ilgili organların kompresyonu ve lokal hipertermi oluşabilmektedir. Kenelere ait ağız sekresyonları, sistemik toksik etkiye sebep olarak, ölümcül olabilen kene felcine; tükürük salgıları, antijenik aktivite ile yangı ve kist oluşumlarına neden olabilmektedir. Kene sokması, alerji ve irritasyon gibi ciddi toksik durumlar oluşturabilmekte; kenelerin kan emme esnasında salgıladıkları birtakım toksinlerle hayvanlarda alerjik reaksiyon ve zehirlenmeler görülebilmektedir. Kenelerin kanla beslendikleri konak hayvanda çok sayıda olmaları, diğer bir deyişle, konağın kenelerin saldırısına uğraması durumunda, bu hayvanlarda, anemi; süt, yumurta, et verim düşüklüğü; deri ve yapağı kalitesinde bozulma ve hatta ölümler gözlemlenebilmektedir (Akdemir, 1996; Kaya, 2011; Keskin, 2009; Özkan, 2013; Yay, 2004).

Keneler, çeşitli hastalık etkenlerinin konağı olduğu gibi, insan ve hayvanlar için birçok bakteri, riketsiya, protozoon, virüs ve helmint hastalıklarının taşıyıcısı olarak vektör görevi görmektedir. Nitekim, keneler, Türkiye'de yaygın olarak tespit edilen Lyme, theilerioz, babesioz, anaplasmoz hastalıklarının biyolojik vektörleridir. Bu arthropodlar infeksiyon etkenlerini, kenenin bir gelişim evresinden diğer gelişim evresine (transtadial) veya dişilerin ovaryumlarındaki yumurtalarına aktarıp, gelecek nesillere bulaştırarak (transovarial) ya da aynı anda bu iki yolla nakledebilmektedir. Keneler görüldüğü üzere direk olan biyolojik etkilerinin yanı sıra (terleme hastalığı, kene felci, soyucu-sömürücü etki), taşıdıkları bakteri, virüs, protozoon ve riketsiya

infeksiyonlarını kendi kuşaklarına ve/veya gelişim evrelerine naklederek, infeksiyonun kuşaklar boyu sürmesine ve bu infeksiyonların ölümcül boyutlara ulaşmasına sebep olmaktadırlar. Ayrıca keneler, sekonder infeksiyon oluşumuna neden olmaları bakımından da önem taşımaktadır. Dolayısıyla, keneler, tam anlamıyla ve her açıdan söz konusu biyolojik aktiviteleri yönünden incelenmelidir (Akdemir, 1996; Özeren, 2009; Yay, 2004).

Keneler, hastalık etkenlerini, tükürük salgısı (Arboviruslar, benekli humma grubu rickettsialar, *B. burgdorferi*); kusma (*Ehrlichia ruminantium*, bazen *B. burgdorferi*); koksal sıvı (relapsing fever grubu rickettsialar) ve dışkı (*Coxiella brunetti*) ile olmak üzere birçok farklı yolla nakledebilmektedirler. Aç kene kanla beslenmek üzere konağını bulduğunda, hipostomları aracılığıyla hem kan emmekte; hem de konağa ağrı kesici, anti-inflamatuar ve immünsupresif özellikteki tükürük salgısını vermektedir. Tükürük bezinin salgıladığı ağız organellerini çimento gibi kaplayan antijenik ve antiseptik özelliğe sahip madde yardımıyla kene konağına tutunabilmektedir. Bu arada tekrar tükürük salgılanarak; içerdiği kimyasal maddeler ile vasküler geçirgenlik bozulmakta; kan damar dışına sızmakta; tükürük salgısının antikoagulant özelliği ile kanın pıhtılaşması engellenip; kene meydana getirdiği bu kan havuzundan beslenmektedir. Her kenenin tükürük salgısı, kendi konağından en verimli biçimde kanla beslenmek amacıyla; konağın immun sisteminde etkili olan birtakım antijenik yapılar içermektedir. Bu nedenle kene türü ve gelişme dönemine göre tükürük salgısının kimyasal yapısı farklılık göstermektedir (Dupejova vd., 2011; Güneş, 2002; Hajnická vd., 2001; Hekimoğlu, 2010; Yay, 2004; Yılmaz, 2010).

I ve II. koksalar arasında yer alan; sayıları 1-4 çift olabilen koksa bezleri su ve iyon dengesini sağlayarak kenelerde boşaltım organı olarak görev yapmaktadır. Kanla beslenme sonucu kenelerde meydana gelen ağırlık koksal sıvı ile atılmaktadır. Kan emilimi sırasında bağırsak ortamının ozmotik basıncının dengede tutulması gerektiğinden, bu ortamda fazla miktarda bulunan iyonların boşaltımı koksa bezleri ile sağlanmaktadır (Ayyıldız ve Doğan, 2010).

Hemeolenf (kan ve lenften meydana gelen sıvı), kenelerde görülen açık dolaşım sisteminin temel birimini olan hemosölde yer almaktadır. Bazı türlerde daha küçük bir yapı gösteren hemosölün epitel dokusu olmadığı için, iç organ dokuları ve hemolenf bazal

membran aracılığıyla birbirinden ayrılmaktadır. Hemolenf, üçgen, yıldız, oval veya dörtgen şekilli hemositleri içeren, açık renkli ya da renksiz olabilen kimyasal bir maddedir. Bu sıvı, lektinler, lizozomler, antimikrobiyal peptidler (defensin, mikroplusin), komplement benzeri proteinler, proteaz ve proteaz inhibitörleri içermekte; enerji, besin ve hormonların taşınmasında; hücresel ve hümoral bağışıklık sisteminde işlev görmektedir (Ayyıldız ve Doğan, 2010; Hajdusek vd., 2013).

Çalışmamızda, yapılan literatür incelemeleri doğrultusunda, dişi *R. sanguineus* kene ekstraktlarının, Ames testi gibi mutajenite testleri kullanılarak bu özelliklerinin daha önceden araştırılmadığı; *in vitro* hücre migrasyonunun Boyden chamber, apoptotik etkilerin Annexin V, hücre proliferasyonunun MTT testi yöntemleriyle, HeLa ve MEF hücre hatları üzerindeki etkileriyle ilgili bir incelenme yapılmadığı; yine bu kene ekstraktlarının çalışmamızda kullandığımız disk difüzyon testi ile, *Serratia entomophila* ATCC 43705, *Bacillus thuringiensis* ATCC 33679, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. typhimurium* TA98, *Escherichia coli* OP50, *Proteus mirabilis* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etkileri konusunda önceden bir çalışma bulunmadığından; bu kenelere ait ekstraktların antimikrobiyal, mutajenik, apoptotik, antiproliferatif ve hücre migrasyonuna etkilerinin araştırılması ilk kez hedeflenip gerçekleştirilmiştir.

# BÖLÜM 2

# GENEL BİLGİLER

## 2.1. Kenelerin Genel Özellikleri

Keneler, dünyanın her yerine yayılabilen ve hatta Antarktika kıtasında da bulunabilen, beslenmeleri sadece kan ile olan ektoparazitlerdir. Kan emerek beslenmeleri sebebiyle birçok hastalık etkeninin vektörü olma işlevlerinin yanı sıra direkt patolojik etkilerinin de olması nedeniyle insan ve hayvan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Ülkemizdeki kenelerle ilgili yapılan bazı çalışmalarda hayvanlardaki kene enfestasyonları incelenmiştir; ancak insanlarda da kene enfestasyonu olabilmektedir. Dolayısıyla, bu vertebralı ektoparazitlerinin özelliklerinin ve biyolojik etkilerinin incelenmesi hem hayvan hem de insan sağlığı için önemlidir (Çizelge 2.2.) (Keskin, 2009; Özbay, 2010).

Kenelerin sistematiği aşağıda verilmiştir (Tilgen, 2010):

Phylum : Arthropoda
Subphylum : Chelicerata
Classis : Arachnida
Ordo : Acarina
Subordo : Ixodida
Superfamilya : Ixodidoidea
Familya : Argasidae (Yumuşak keneler)
Ixodidae (Sert keneler)
Nutalliellidae
Laelaptidae

Kenelerin Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae ve Laelaptidae olmak üzere 4 familyası, bu familyalara ait 18 cinsi ve bu cinslere ait ortalama 878 türü bulunmaktadır (Çizelge 2.1.).

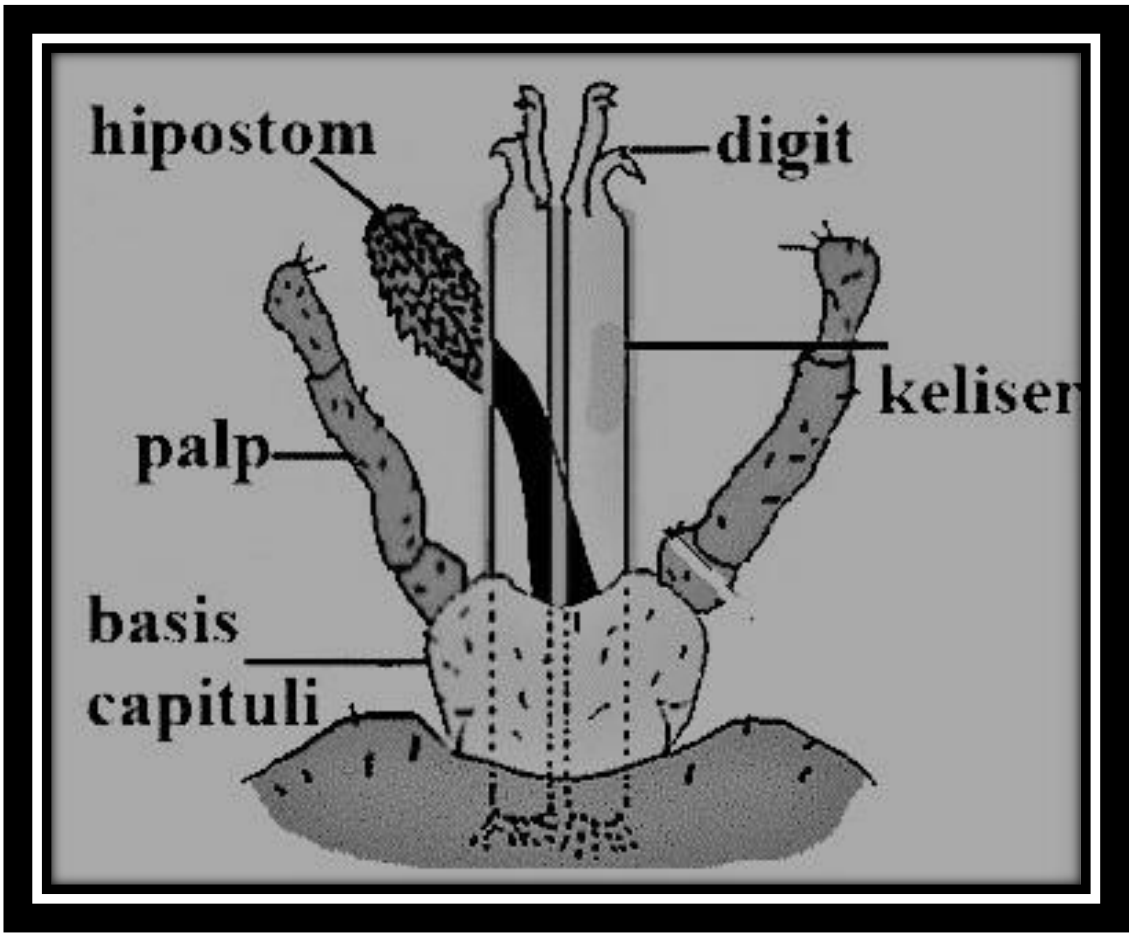
**Çizelge 2.1**. Kene cinslerine ait ortalama tür sayıları (Tilgen, 2010)

| Familyalar | Kene cinsleri | Kene cinslerine ait ortalama tür sayıları |
|---|---|---|
| Ixodidae | *Amblyomma* | 131 |
| | *Rhipicephalus* | 74 |
| | *Anomalohimalaya* | 3 |
| | *Rhipicephalus (Boopilus)* | 5 |
| | *Bothriocroton* | 5 |
| | *Rhipicentor* | 2 |
| | *Cosmiomma* | 1 |
| | *Nosomma* | 1 |
| | *Dermacentor* | 34 |
| | *Hyalomma* | 24 |
| | *Margaropus* | 3 |
| | *Ixodes* | 245 |
| | *Haemaphysalis* | 164 |
| Nuttalliellidae | *Nuttalliella* | 1 |
| Argasidae | *Ornithodorus* | 35 |
| | *Argas* | 58 |
| | *Otobius* | 3 |
| | *Carios* | 88 |
| Laelaptidae | *Gammaridacarus* | 1 |
| | Toplam | 878 |

Kenelerin morfolojileri incelendiğinde, kenelerin boyları 2-20 mm arasında olduğu için gözle görülebilen, aynı zamanda kan emme sonucunda ağırlıkları 100 kat artabilen akarlardır. Vücutlarını kaplayan kütikül tabakasının Argasidae ve Ixodidae

familyalarındaki kitinizasyon ve bunun vücuttaki dağılımı farklı olduğu için, Argasidae'ler yumuşak kene, Ixodidae'ler ise sert kene olarak isimlendirilir. Bu kitinizasyon ve dağılım şu şekildedir: Argasidae familyasında kütiküldeki kitin oranı daha azdır ve vücuda dağılımı daha homojendir. Ixodidae familyasında ise, kitin oranı kenenin gelişme evresine ve cinsiyetine göre değişir vücudun bazı kısımlarında artış gösterir. Ixodidae'lerin dorsalinde skutum olarak isimlendirilen sert kitin tabakaları, erkeklerde tüm vücudu örter ve *konskutum* olarak adlandırılır. Bu kene yapısı larvalarda, nimflerde ve tüm dişilerde başın arka kısmında yarım ay veya yaka şeklindedir ve *skutum* adını alır. Skutumun posteriorunda *alloskutum* olarak isimlendirilen bir vücut bölgesi yer almaktadır. Ayrıca, kenenin kitinsi yapıları arasında, Ixodidae'lerde stigmanın çevresinde bulunan peritrem ve ventral yüzeyde bulunabilen anal ve adanal plaklar da bulunmaktadır. Keneyi kurumaktan ve yaralanmaktan bu kitinsi yapılar korumaktadır (Hekimoğlu, 2010; Kılıç, 2008).

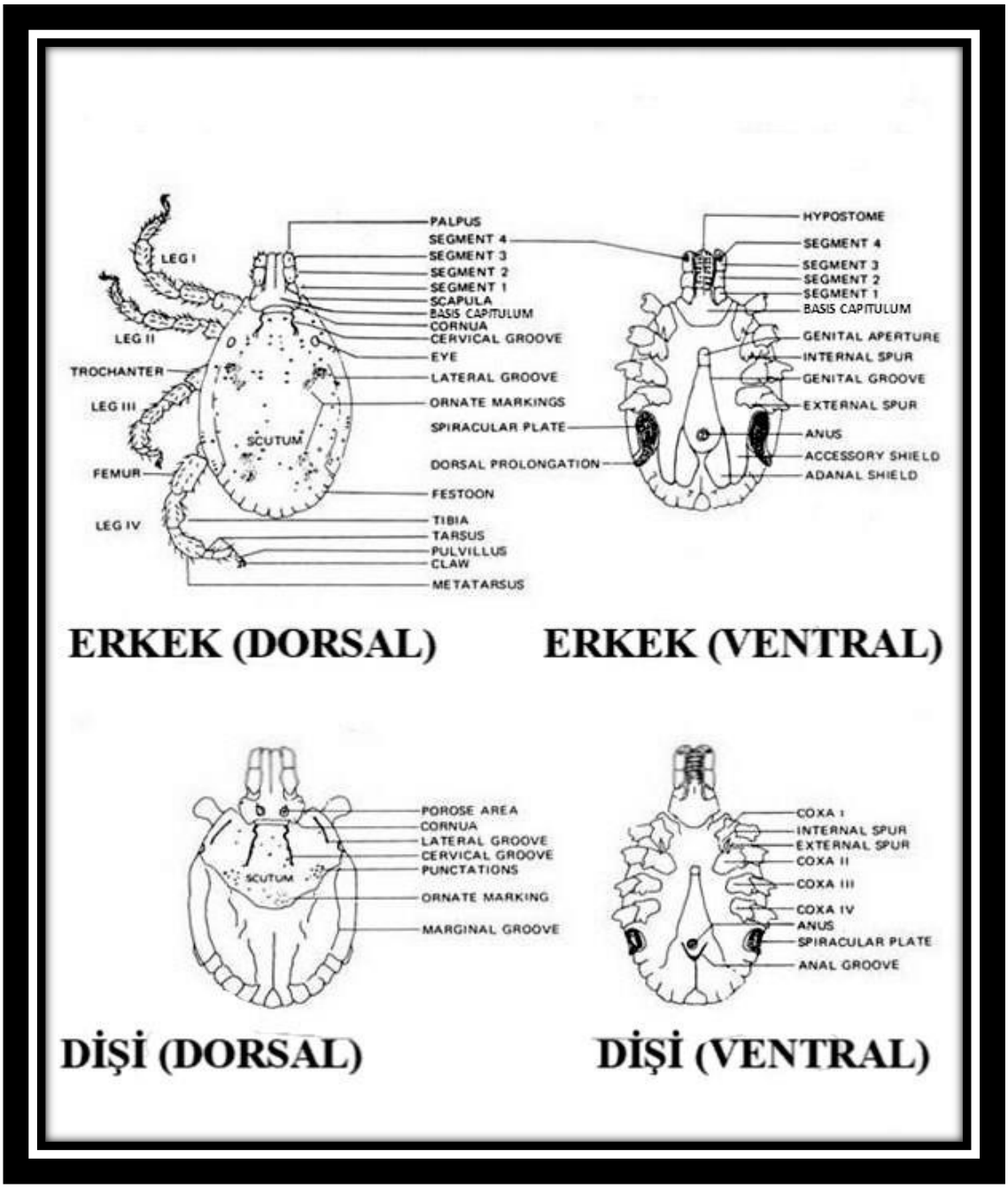
Basis capituli, gnathsoma, palp ve hipostom gibi ağız organellerinin yer aldığı *gnathosoma* ve tek parça olan ve vücudun diğer kısımlarının yer aldığı *idiosoma* olarak isimlendirilen kısımlar kenelerin vücut yapısını oluşturur. Bu yapılar incelendiğinde, palplerin dört parçalı olduğu, iç yüzünden hipostom ve keliseri içine aldığı, hem santral hem de ventralde yer alan hipostomların ise keliserler ve dişciklerden meydana geldiği görülmektedir (Şekil 2.1.). En uç kısmında *digit* olarak isimlendirilen üç dişli bir makas görünümünde yapıları olan keliserlerin, konak derisini parçalamak ve erkeklerde çiftleşmede dişçiklerin, konak derisine açılarak kan emme esnasında fonksiyon görmek; hipostomun ise, tükürük salgısındaki bazı maddelerle birlikte kenenin konağa sabitlenmesini sağlamak gibi işlevleri bulunmaktadır. Dişilerde basis capituli üzerinde bulunan poros area olarak adlandırılan bu süngerimsi yapıların, yumurtanın korunması için salgı üreten Gene organı'nın işlevini kolaylaştırmak için antioksidanlar salgıladığı düşünülmektedir (Özkan, 2013).




**Şekil 2.1.** Ixodidae familyasına ait kenelerde baş (kapitulum) yapısında gözlemlenen palp, hipostom, keliser, basis capituli ve digit yapıları (All About Dogs by LowchensAustralia, 2009)

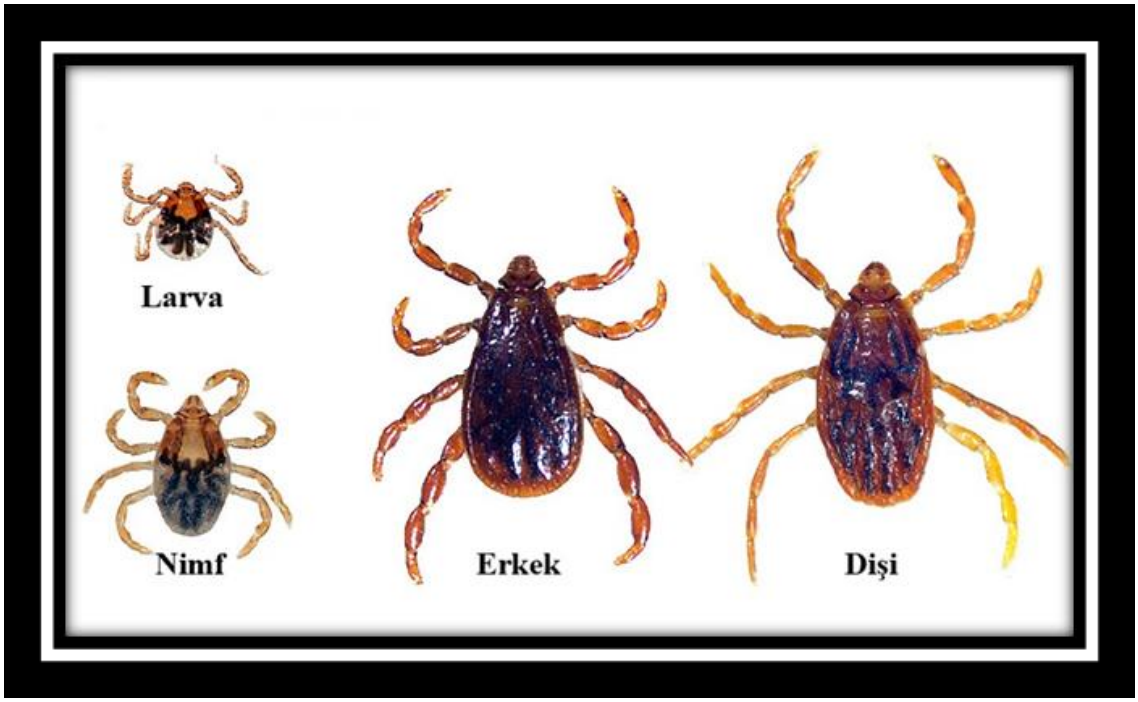
*Basis capitulinin* arka kısmında yer alan idiosoma olarak isimlendirilen vücut yapısı incelendiğinde, sadece bazı türlerde bulunmak üzere, dorsalde, ikinci çift ekstremitelerin hizasında ve lateral bölgede bir çift göz bulunmaktadır. Benzer şekilde, yine sadece bazı türlerde posterokaudal sınır üzerinde festonlar yer alabilmektedir. Larvalar, solunumu vücut yüzeyi ile yaptıkları için larvalarda bulunmamak üzere, ventralde, dördüncü koksanın arkasında, lateral bölgede sağ ve solda birer tane olmak üzere iki tane stigma bulunur. Sadece erişkin kenelerde olmak üzere, ventralde birinci ve ikinci koksa arasında genital açıklık; dördüncü ekstremite hizasında anal delik bulunmaktadır. Koksa, trohanter, femur, tibia ve tarsus olarak isimlendirilen 5 parçadan oluşan bacaklar, erişkinlerde dört, nimfler ve larvalarda ise üç çift olarak gözlemlenir. Argasid nimf ve erişkinlerinde bulunmayan, beş eklemli tarsusun en son parçasında yer alan pulvillus, ixodidaelerde iyi gelişmesi nedeniyle kenelerin düz yüzeylere tırmanabilmesini

sağlamaktadır. Bütün kenelerin bütün gelişim evrelerinde görülen Haller organı ise, birinci çift tarsusların dorsal yüzeyinde yer almaktadır. Ön kısımda yer alan oluk ve arkada bulunan kapsül yapısıyla gözlemlenen Haller organının sahip olduğu sensillalar, konak derisinden gelen koku ve kimyasalları; havadaki nem ve ısı değişimlerini algılayabilmesini sağlamaktadırlar. Seta adı verilen dorsal vücut yüzeyinde yer alan sert kıllar, kenelerde duyu reseptörü fonksiyonu görmektedirler. Ixodidae familyasına ait erkek ve dişi kenelerin dorsal ve ventral morfolojik karakterleri Şekil 2.2.'de gösterilmiştir (Orhan, 2009; Özkan, 2013).




**Şekil 2.2.** Ixodidae familyasına ait erkek ve dişi kenelerin dorsal ve ventral morfolojik karakterleri (The TickApp for Texas and The Southern Region, 2011)

Yaşam döngüsünde eksik başkalaşım (hemimetabol) görülen kenelerin bu yaşam döngüsü içinde, yumurta, larva, nimf ve erişkin olmak üzere dört gelişim evresi geçirdiği görülmektedir (Şekil 2.3.). Ixodidae familyasına ait keneler bir, Argasidae familyasına ait keneler ise iki ya da daha çok nimf dönemi geçirmektedirler (Özeren, 2009).




**Şekil 2.3.** *R. sanguineus* yaşam evreleri (TickEncounter Resource Center, 2018)

20 yıla kadar varan yaşam süresi gösteren kenelere rastlansa da keneler çoğunlukla birkaç yıl yaşarlar. Kanla beslenmek için keneler kendilerine uygun konak seçerken, vücut kokusu, ısısı; salgılarındaki laktik asid, bütirik asid; idrardaki $NH_3$; nefesteki $CO_2$; fekal atıktaki skualen gibi konak özelliklerinden etkilenir. Kendisine uygun konak seçimini yapan keneler, daha sonra konaktaki kan emecekleri bölgeyi seçerler. Keliserleri yardımıyla seçtikleri bu bölgeyi delip, palpleri derinin dışında kalacak ve yatay olarak konumlanacak şekilde, hipostomlarını deriden içeriye sokarlar. Tükürük salgısı yardımıyla konağa kendisini sabitleyen keneler, hipostomun dişçiklerinin konak derisi üzerinde açılıp, pozisyonunu korumasıyla da, kan emme mekanizmalarını yürütmektedir. Her ne kadar partenogenezle çoğalma da görülebilse de, kenelerde genellikle eşeyli üreme görülür. Ixodidae familyasına ait kenelerde kan emme işlemi çiftleşmeyi uyardığı için, çoğunlukla konak üzerinde, dişinin genital deliğinin açılması, erkek kenenin keliser ve hipostomunun işleviyle sağlanmakta ve çiftleşme gerçekleşmektedir. Çiftleşmeden sonra döllenmiş dişinin yumurtlamaya başlama süresi, yumurta sayısı türe göre değişiklik göstermektedir. Yumurtlama esnasında Gene organı yumurtaları mum benzeri bir maddeyle kaplayarak, larvalar çıkana kadar, yumurtaların sıcak havadan olumsuz etkilenip su kaybetmelerinin önlenmekte; bu yumurtalardan, 20

gün gibi bir süre sonra stigması bulunmayan ve üç bacaklı larvalar çıkmaktadır. Kitinizasyonları tamamlanan bu larvalar kendilerine uygun konağı, Haller organının hava akımı, nem, sıcak, titreşim ve kokuyu algılayabilmesi sayesinde tespit ederler (Hekimoğlu, 2010; Keskin, 2009; Orhan, 2009; Özbay, 2010).

Kenelerin larva dönemlerinde su kaybı, stigma ve trakeal sisteme sahip olmadıkları için sadece kütikül ile olmaktadır. Konak bulamayan larvalar, kaybettikleri suyu atmosferden alarak telafi edebilmek için nemli ve toprağa yakın alanlara giderken; konak bulan larvalar, konakta doyana kadar kanla beslendikten sonra, nimf haline gelebilmek için gömlek değiştirirler. Nimf evresindeki kene de bulduğu konağından kanla beslenip doyduktan sonra düşerek yine gömlek değiştirir ve erişkin dönemine geçer. Erişkin hale geçen erkek ve dişi keneler de konaklarından kan emerek beslenirler. Bu yaşam döngüsünün sonunda, dişi keneler yumurtlamanın ardından, erkek keneler ise çiftleşmeden sonra ölmektedirler (Över, 2009).

Konak seçiciliği larva ve nimflerde erişkinlere göre daha az olmak üzere, keneler, birçok omurgalıyı konak olarak seçebilirler. Ixodidae familyasına ait keneler, farklı sayıda konakta kanla beslenebilmektedir. Bazı sert keneler, bir konakta gelişim gösterir. Bu kenelerin yaşam döngüsünde, yumurtadan çıkan larva, konağını bulup, doyana kadar kanla beslendikten sonra, gömlek değiştirmesini de konak üzerinde yaparak nimf dönemine geçer. Aç nimfler tekrar aynı konakta doyana kadar kanla beslendikten sonra, bu konakta gömlek değiştirip erişkin evreye geçerler. Aç erişkin dişi ve erkek keneler, kanla beslendikten sonra çiftleşme gerçekleşir. Daha sonra, dişi erişkin keneler konaktan toprağa düşüp, yumurtladıktan sonra ölürler. Dolayısıyla bu sert kenelerin bütün gelişim evreleri aynı konakta geçmektedir. Bir konakta gelişim gösteren kenelere örnek olarak *B. annulatus* türü verilebilir. İki konakta gelişim gösteren kene türlerinde ise, larva ve nimf evrelerinin bir konakta, erişkinlik evresinin ise başka bir konakta geçmesi söz konusudur. *Hyalomma* sp. iki konaklı kenelere örnek olarak verilebilir. *R. sanguineus* kene türünde olduğu gibi bazı kene türlerinde de larva nimf ve erişkin gelişim evreleri 3 farklı konakta geçmektedir (Şekil 2.4.) (Aydoğan, 2008; Ekici, 2011; Över, 2009).




**Şekil 2.4.** *R. sanguineus* yaşam döngüsü (Featured Creatures Entomology and Nematology, 2018)

**Çizelge 2.2.** İnsanları sıklıkla enfeste eden kene türleri, coğrafi dağılımları ve taşıdıkları patojenler (Hekimoğlu, 2010).

| Kene türleri | Coğrafi dağılım | Kenelerin taşıdığı patojenler |
|---|---|---|
| *Amblyomma variegatum* | Karayip Adaları, Afrika | Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü |
| *A. americanum* | Kuzey Amerika (Doğu) | *Borrelia lonestari, Ehrlichia chaffeensis, Francisella tularensis* |
| *A. hebraeum* | Güney Afrika | *Rickettsia africae* |
| *A. cajennense* | ABD (Texas), Orta ve Güney Amerika, Meksika | *R. rickettsii* |
| *Carios rudis* | Güney Amerika, Panama | *B. venezuelensis* |
| *C. erraticus* | Ortadoğu, Güneydoğu Avrupa, Kuzey ve Doğu Afrika | *B. hispanica, B. crocidurae* |
| *Dermacentor variabilis* | Kuzey Amerika (Batı ve Doğu) | *F. tularensis, R. rickettsii* |
| *D. andersoni* | Kuzey Amerika (Batı) | *R. rickettsii, F. tularensis,* Kolarado kene ateşi virüsü |
| *D. silvarum* | Rusya, Moğolistan, Doğu Avrupa | Kene kökenli ensefalit virüsü |
| *D. marginatus* | Avrasya, Türkiye | *Coxiella burnetti,* Kene kökenli ensefalit vürüsü, *R. slovaca,* Omsk kanamalı ateşi virüsü |
| *D. occidentalis* | Kuzey Amerika | *R. rickettsii, F. tularensis, C. burnetti,* Kolarado kene ateşi virüsü |
| *D. reticulatus* | Avrasya | *R. conori, F. tularensis, R. sibirica,* Omsk kanamalı ateşi virüsü |
| *D. nuttalli* | Rusya, Çin, Moğolistan | *F. tularensis, R. sibirica* |
| *Hyalomma anatolicum* | Rusya, Yakın Doğu, Güney Avrupa, Türkye | Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü |
| *Haemaphysalis concinna* | Orta Avrupa, Uzak Doğu, Rusya | Kene kökenli ensefalit virüsü |

**Çizelge 2.2.** (devamı) İnsanları sıklıkla enfeste eden kene türleri, coğrafi dağılımları ve taşıdıkları patojenler (Hekimoğlu, 2010; Lo vd., 2006; Şen (Güner), 2003a; Şen (Güner), 2003b; Şen (Güner), 2004a; Şen (Güner), 2004b; Şen, 2011)

| | | |
|---|---|---|
| *H. aegyptium* | Türkiye, Avrupa | *Borrelia turcica* |
| *H. asiaticum* | Ortadoğu ve Orta Asya | Kırım Kongo Kanamalı Ateşi |
| *H. marginatum* | İsrail, Afrika, Yemen, Güney Avrupa, Türkiye, Rusya | *R. aeshlimanni,* Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü |
| *Ixodes scapularis* | Kuzey Amerika | *B. burgdorferi, Babesia microti, Anaplasma phagocytophilum* |
| *I. persulcatus* | Kuzey Asya, Kuzeydoğu Avrupa | Kene kökenli ensefalit virüsü, *Borrelia* spp. |
| *I. holocyclus* | Avustralya | *R. australis* |
| *I. ricinus* | Avrupa, Türkiye | *Borrelia* spp., *B. divergens, A. phagocytophilum, R. conori,* Kene kökenli ensefalit virüsü |
| *I. cookei* | Kuzey Amerika | Powassan virüsü |
| *I. pacificus* | Kuzey Amerika (Batı) | *B. burgdorferi, Babesia* spp., *A. phagocytophilum* |
| *Ornithodoros asperus* | Irak, Kafkaslar | *B. caucasica* |
| *O. moubata* | Afrika | *B. duttoni* |
| *O. turicata* | Kuzey Amerika (Güney) | *B. turicatae* |
| *O. hermsi* | Kuzey Amerika (Batı) | *B. hermsii* |
| *O. tartakovskyi* | Orta Asya | *B. latyschewii* |
| *R. sanguineus* | Her yerde | *R. conori, E. canis, B. canis* |

Türkiye'de yaklaşık olarak 32 kene türünün tespit edildiği ifade edilmiştir (Çizelge 2.3.).

**Çizelge 2.3.** Türkiye'de tespit edilen kene cinsleri ve türleri (Bakırcı, 2009; Över, 2009)

| **Kene cinsleri** | **Kene türleri** |
|---|---|
| **Argasidae familyası** | |
| *Argas* spp. | *(Argas* spp. nimfleri*)*<br>*A. reflexus*<br>*A. persicus*<br>*A. vespertilionis* |
| *Ornithodoros* spp. | *Ornithodoros lahorensis*<br>*O. coniceps*<br>*O. tholozani* |
| *Otobius* spp. | *O. megnini* |
| **Ixodidae familyası** | |
| *Ixodes* spp. | *Ixodes hexagonus*<br>*I. vespertiionis* (*Ixodes* spp. larva ve nimfleri*)*<br>*I. frontalis*<br>*I. ricinus*<br>*I. laguri* |
| *Rhipicephalus* spp | *Rhipicephalus annulatus*<br>*R. turanicus*<br>*R. bursa*<br>*R. sanguineus* |
| *Boophilus* spp. | *Boophilus kohlsi* |
| *Hyalomma* spp. | *Hyalomma plumbeum*<br>*(Hyalomma* spp. *nimfleri)*<br>*H. anatolicum anatolicum*<br>*H. aegyptium*<br>*H. anatolicum excavatum*<br>*H. dromedarii*<br>*H. marginatum*<br>*H. detritum*<br>*H. rufipes* |
| *Dermacentor* spp. | *Dermacentor niveus*<br>*D. marginatus* |
| *Haemapysalis* spp. | *Haemaphysalis parva (Haemapysalis* spp. larva ve nimfleri)<br>*H. inermis*<br>*H. otophila*<br>*H. punctata*<br>*H. numidiana*<br>*H. sulcata*<br>*H. concinna* |
| *Amblyomma* spp. | *Amblyomma variegatum* |

## 2.2. Çalışmada Kullanılan Kene, Bakteri ve Hücre Hatları

- ***R. sanguineus* keneleri:** *R. sanguineus* kompleksinde (*R. sanguineus* sensu lato) 12 tür bulunmaktadır. Bunlardan Türkiye'de bulunan türleri ise, *R. sanguineus, R. annulatus, R. bursa* ve *R. turanicus* keneleridir. "Kahverengi köpek kenesi" ya da "köpek kulübesi kenesi" şeklinde de bilinen *R. sanguineus* türü keneler, her ne kadar birçok hayvanı konak olarak kullanabilse da, yaygın olarak köpeklerde bulunmaktadırlar. Bu keneler aynı zamanda insanı da ısırdığı bilinen üç konaklı kenelerdir. Dünya üzerinde farklı coğrafi bölgelere yayılımı en çok olan kene türlerinden olan bu kenelerin soğuk bölgelerde yaşayanları her gelişme dönemini, evdeki duvar veya eşyalar olmak üzere bina ortamlarında geçirebilen nadir kenelerdendir (Şekil 2.5., Şekil 2.6.). Bu keneler, *Rickettsia conori, Ehrlichia canis, Babesia canis* vektörüdür (Coimbra-Dores vd., 2016; Hekimoğlu, 2010; Orkun, 2018; Över, 2009). Çalışmalarımızdaki hücre kültürleri, Ames testi ve disk difüzyon testinde, Edirne İli'nden örneklediğimiz dişi *R. sanguineus* keneleri kullanılmıştır.

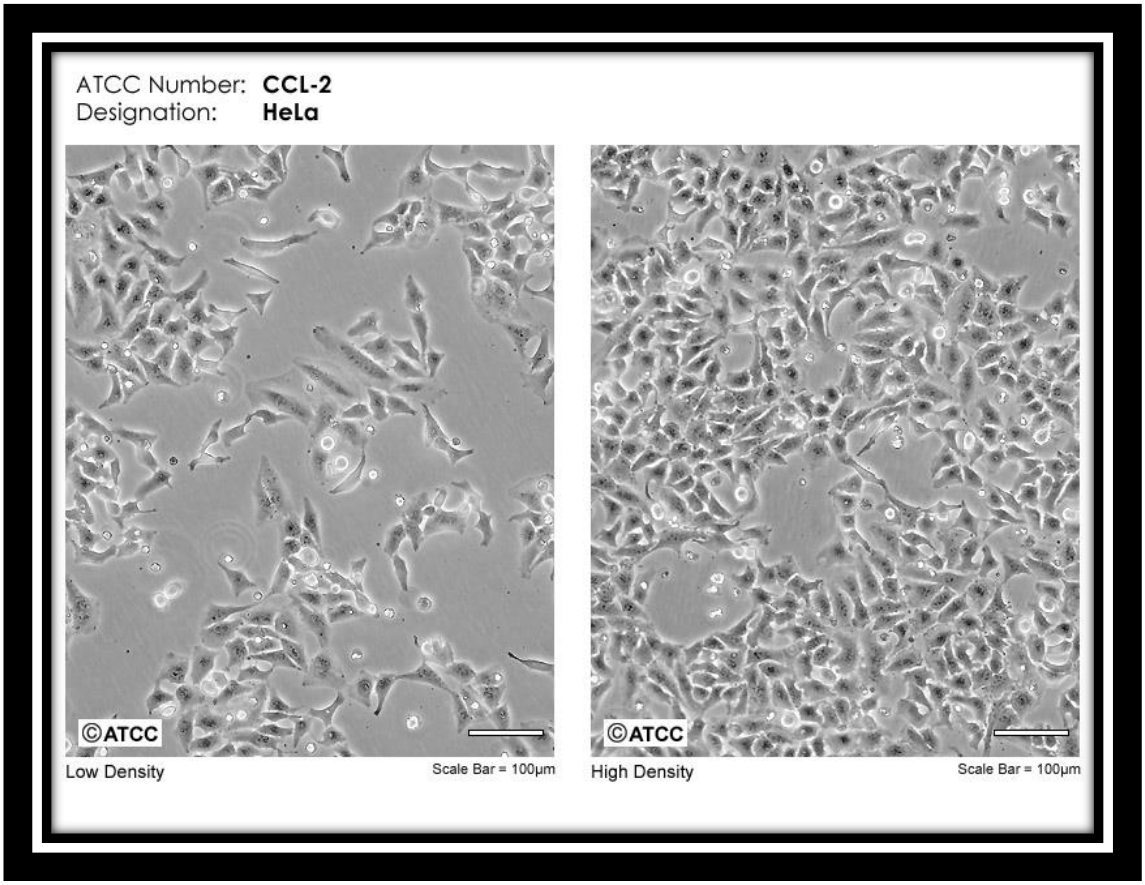


**Şekil 2.5.** *R. sanguineus* (10x)



**Şekil 2.6.** *R. sanguineus* (40x)

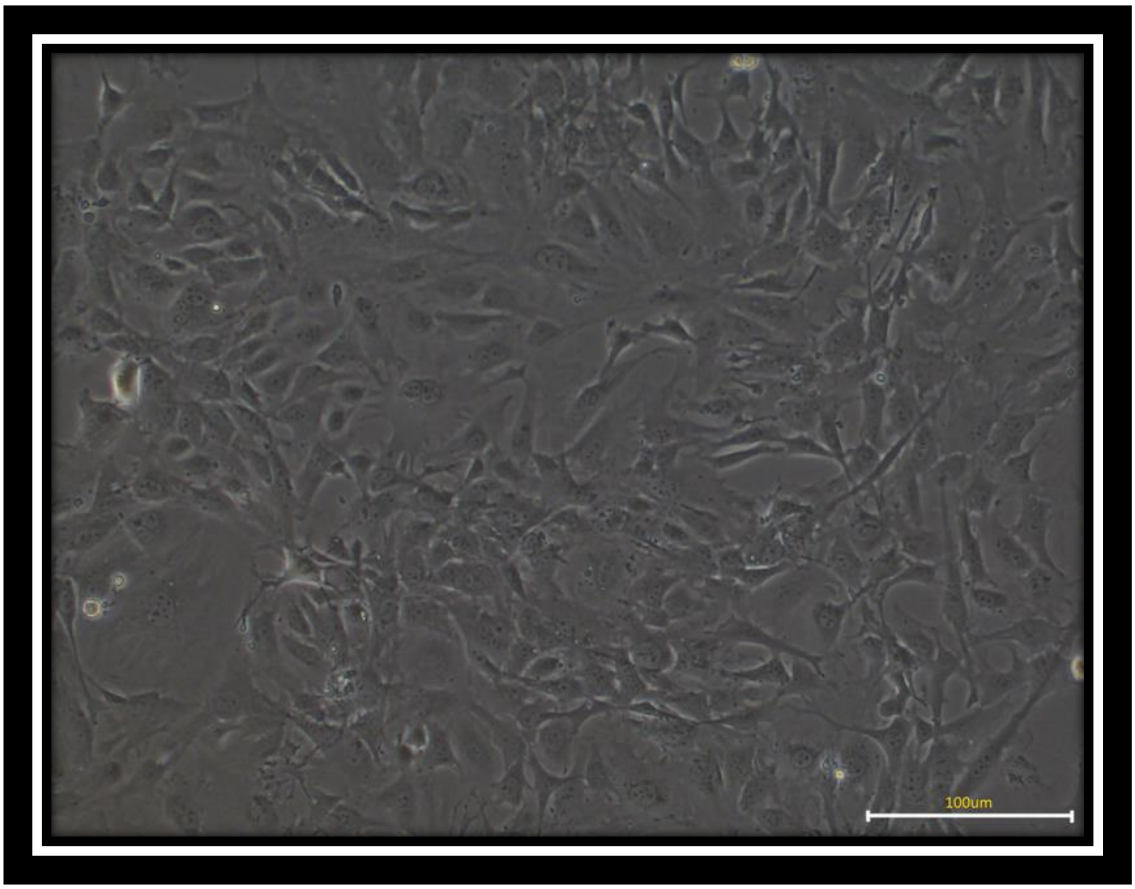
- **HeLa hücre hattı:** George Gey ve arkadaşları 1952 yılında, insan servikal karsinomasından HeLa hücre soyunu üreterek; insan tümörlerinin devamlı hücre hatları verebildiklerini göstermeleri ile ölümsüz kanser hücre hatlarında ilk başarılı çalışmayı yapmıştır (Şekil 2.7.). Literatürde tanımlanan yaklaşık 3000 kanser hücre hattı içerisinde hala bugün araştırmalarda en çok kullanılanlar arasında olan bu kanser hücre soyu, ABD'de, servikal kanser nedeniyle ölen Henrietta Lack isimli bir hastanın kanserli dokularının laboratuvarda kültürü yapılmasıyla elde edilmiştir. Hücre hattının ismi de, bu kişinin adının ve soyadının ilk iki harfi alınarak "HeLa" şeklinde oluşturulmuştur (Uçbek, 2012; Yaylalı, 2007). Çalışmalarımızdaki MTT testi, Boyden Chamber testi ve Annexin V testinde, epitel hücre morfolojisinde ve adherent özelliği olan (Kayacan, 2015) HeLa (insan servikal adenokarsinoma) hücre hattı (ATCC CCL-2) kullanılmıştır.




**Şekil 2.7.** HeLa (insan servikal adenokarsinoma) hücre hattı (ATCC CCL-2) (ATCC, 2016)

- **MEF [Mouse embryonic fibroblast (fare embriyonik fibroblast)] hücre hattı:** Fare embriyosundan hazırlanan bu fibroblast hücreleri, fibroblastların tipik bir özelliği olarak iğ şeklinde görünen, sınırlı bir hücre hattıdır (Şekil 2.8.). Bununla birlikte, araştırmacılar, MEF hücrelerini ölümsüz hale getirmek için, virüs enfeksiyonu ya da transmisyon gibi çeşitli stratejiler kullanabilmekte; MEF'lerin sınırsız çoğalmasına olanak sağlanabilmektedir. New York Üniversitesi'nde George Todaro ve Howard Green isimli iki araştırmacı, 1962'de MEF'leri transmisyonla ölümsüzleştirilmiş ve bu hücreler, yaygın olarak kullanılan bir hücre hattı olan NIH 3T3'e dönüştürülmüştür. MEF'ler, özellikle kök hücre biyolojisi araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Amand vd., 2016; Todaro ve Green, 1963; Xu, 2005). Mitomisin veya gama ışınları ile muamele edilen MEF'ler (bu muamele, MEF hücrelerinin mitozu durdurmasını sağlar), embriyo içindeki mikro ortamı taklit edebildikleri için, embriyonik kök hücre kültüründe besleyici olarak kullanılmaktadır (Conner, 2001; Jozefczuk vd., 2012).

2006 yılında MEF'lerin indüklenmiş pluripotent kök hücrelerine [IPSC (induced pluripotent stem cells)] yeniden programlaması da; kök hücre biyolojisinde dikkati çekici bir gelişme olmuştur (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Çalışmalarımızdaki MTT testi, Boyden Chamber testi ve Annexin V testinde, adherent özelliği olan MEF [Mouse embryonic fibroblast (fare embriyonik fibroblast)] (ATCC SCRC-1040) hücre hattı kullanılmıştır.




**Şekil 2.8.** MEF [Mouse embryonic fibroblast (fare embriyonik fibroblast)] hücrelerinin doku kültürü kabındaki bir görüntüsü (Wikivisually, 2019).

- ***Salmonella typhimurium*:** Gram negatif, basil/çubuk şekilli, peritrik kirpikleri sayesinde hareketli, kapsülsüz, sporsuz, aerob veya fakültatif anaerob olan *S. typhimurium* bakterisinde de, *Salmonella*'ların bütün serovarlarında olduğu gibi somatik (O) antijeni bulunmaktadır. Bu polisakkarit, protein ve lipitlere bağlı bir antijendir ve hapten özelliğindedir. Bu antijene 3-4 adet monosakkarit bağlıdır ve bunların meydana getirdiği oligosakkarit gruplar özgül antijenliği sağladığı için

bu bakteri, asitler, ısı ve alkole karşı dirençlidir. Böylelikle, %96'lık alkolde 4 saat, 110 $^{o}$C' deki ısıda 2.5 saat direnç gösterebilmektedir. *S. typhimurium,* bulantı, ateş, kusma gibi belirtilerle gastroenterit, bakteriyemi infeksiyonlarına neden olmaktadır (Öztürk, 2012). Çalışmalarımızdaki disk difüzyon testinde *S. typhimurium* ATCC 13311 ve *S. typhimurium* ATCC 14028, Ames testinde de *S. typhimurium* TA98 suşu kullanılmıştır.

- ***Serratia entomophila*:** *S. entomophila*, Enterobacteriaceae familyasına ait gram negatif, biyolojik mücadelede önemli olan türlerden biridir ve spesifisite gösterdiği *Costelytra zealandica'*nın patojenidir. İlk olarak, amber hastalığı ile enfekte olan *Costelytra zealandica*'dan izole edilmiş; bu çim kurtçuğuna karşı biyoinsektisit olarak kullanılmıştır. Bu bakteriler, ağızdan alındığında ön bağırsakta kolonize olup; konukçuda yemeden kesilmeye sebep olmaktadır. Hastalığın ilerleyen aşamalarında art bağırsakta da kolonize olup; genel septisemiye son safhalarda sebep olabilmekte; böcek bu nedenle ve/veya açlıktan ölmektedir (Atmaca vd., 2018; Grimont vd., 1988; Kılınçer vd., 2010). Çalışmamızdaki disk difüzyon testinde *S. entomophila* bakterileri kullanılmıştır.
- ***Bacillus thuringiensis*:** Bacillaceae familyasına ait, gram pozitif, spor oluşturan, çomak şekilli, aerobik özelliğe sahip; böcek kontrolünde bakteriyel ajan olarak kullanılan ve pek çok böcek türüne karşı patojenik etkisi olduğu bilinen bakterilerdir. Bu bakteriler, toprak, sucul ortamlar, yaprak yüzeyleri, hayvan dışkıları, tahıl depolarının yanı sıra, böceklerin yoğun olduğu ortamlarda, çeşitli tırtıl ve güvelerin bağırsaklarında bulunabilmektedir. Sporulasyon sırasında, birçok *B. thuringiensis* suşu böcek öldürücü etkiye sahip olan delta-endotoksin olarak adlandırılan kristal proteinleri (protein yapıda inklüzyonlar) üretmekte; bu durum, biyolojik insektisit olarak kullanılmalarını sağlamaktadır. Kristal üreten birçok *B. thuringiensis* suşu bulunmaktadır (Aslan ve Güzel, 2009; du Rand, 2009; Ediz ve Beyatlı, 2005; Kaynar ve Beyatlı, 2006; Roh vd., 2007). Çalışmamızdaki disk difüzyon testinde *B. thuringiensis* ATCC 33679 kullanılmıştır.
- ***Bacillus cereus:*** Bacillaceae familyasına ait, gram pozitif, aerobik, çomak şekilli, kapsülsüz, hareketli, sporları terminal veya subterminal *B. cereus* insan ve hayvanlarda hastalık meydana getiren bakterilerdir. Doğada; suda; sporları

sebebiyle et ve süt ürünlerinde bulunabilmekte ve ekonomik kayıplara sebep olmakta; genel habitatları toprak olduğu için, bahçe ve tarladaki ürünlere kolaylıkla bulaşabilmekte ve toprakta da yaygın olarak bulunmaktadırlar. Saprofit bakterilerdir; ancak fazla miktarda ($>10^6$/g) alındığında gıda zehirlenmelerine neden olabilmekte; fırsatçı patojen özelliğiyle de, osteomiyelit, apse, endokardit, göz içi ve üriner infeksiyonlara da yol açabilmektedir (Ediz ve Beyatlı, 2005; Kalaylı ve Beyatlı, 2003; Kalkan ve Halkman, 2006; Kaynar ve Beyatlı, 2006; Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Çalışmamızdaki disk difüzyon testinde *B. cereus* bakterileri kullanılmıştır.

- ***Escherichia coli*:** Enterobactericeae familyasına ait, gram negatif, endospor oluşturmayan, fakültatif anaerob, bazen hareketli, laktoz ve glikozu fermente eden, IMVIC reaksiyonu (++--), birçok serotipi bulunan bir koliform olan bakteri, kokobasil şekilli, 1-2 µm uzunluk ve 0,1-0,5 µm çap boyutlarındadır. *E. coli*, SS (Salmonella-Shigella) besiyerinde pembe renkli; EMB (Eozin Metilen Blue) besiyerinde koyu ve metalik renkli; saf agarda, hafif kabarık, 2-3 mm çapına sahip, yuvarlak, kenarları düzgün, gri-beyaz renkli; kanlı agarda hafif nemli görünümlü, 1-2 mm çapında gri renkli; Mac Conkey agarda ise, kuru, pembe-kırmızı renkli koloniler oluşturmaktadır. Buyyonda, peptonlu suda homojen bir bulanıklık ve dipte hafif bir çökelti oluşturarak bol miktarda üreme göstermektedir. Serolojik veya virulans faktör varlığına göre alt bölümlere ayrılan *E. coli*, serotiplendirmede kamçı (H), somatik (O) ve kapsüler (K) antijeni bulundurmaktadır. Su ve gıda yoluyla alınıp, insan ve sıcakkanlı hayvanların kalın bağırsak mukozası ile ince bağırsağın son kısmına tutunan bu bakteriler, bu ortamlara yerleşip; aylarca ya da uzun yıllar boyunca bu habitatlarda kalıp, normal mikrofloranın bir üyesi olarak, zararlı mikroorganizmaların kolonizasyonunun önlenmesinde işlev görmektedirler. Önemli fırsatçı patojenlerden olan *E. coli* bakterisinin başlangıçta zararsız olduğu düşünülmüş; sonraları bu bakterinin çok farklı virulans faktörlerine sahip olduğu ortaya konmuş; hem enteropatojenik hem de enterotoksijenik olduğu belirtilmiştir. *E. coli'nin* intestinal patojen olan bazı suşları olduğu gibi, bu bakteriler, ekstraintestinal enfeksiyonlara da sebep olmaktadır. Böylelikle, *E. coli* bakterileri normal mikroflora elemanı olmaları dışında uygun koşullar olduğunda üreyerek, bağırsak dışı infeksiyonlar

oluşturmakta; gıda ürünlerinde fekal kontaminasyon indikatörü olarak kabul edilmektedirler. En çok görüleni idrar yolu infeksiyonları olmak üzere, erken ve yeni doğanda menenjit, safra kesesi infeksiyonları, sepsis, apandisit, peritonit, yara infeksiyonlarına da neden olmaktadırlar. Kolisin ve hemolizinin de tesiri olmakla beraber, intestinal infeksiyonlarda, enterotoksin yapımı, fimbrial adhesinleri ve kapsül yapısı rol oynamaktadır. Sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında yaşamaya uyum sağlayarak bu ortamları doğal habitatları haline getiren bu bakteriler dolayısıyla; optimum 37 °C, minimum 4 °C, maksimumu 46 °C olmak üzere, en uygun olarak vücut sıcaklığında, pH 7-7,2'de gelişim gösterip; pastörizasyon ya da kaynatma ile ölmektedir. Isıya çok dayanıklı olmamakla beraber; 55 °C'de 1 saat, 60 °C'de 20 dakika kadar dayanıklılık gösterip; doğal habitatları olan sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarından antibiyotik kullanımı ile uzaklaştırılabilmektedirler (Öztürk, 2012; Yalçın, 2014). Çalışmamızdaki disk difüzyon testinde *E. coli* OP50 suşu kullanılmıştır.

- ***Proteus mirabilis*:** Gram (-), kirpikli, kapsülsüz, sporsuz ve üreaz enzimi üreten basillerdir. Bağırsak bakterilerine ait karakteristik özellikleri taşıyan bu bakteriler, katı besiyeri ortamında yayılarak üreme göstermektedir. *P. mirabilis* bakterileri, nozokomiyal (hastane kökenli) enfeksiyonlar, idrar yolu ve böbrek enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Öztürk, 2009; Özbakır, 2011). Çalışmamızdaki disk difüzyon testinde *P. mirabilis* bakterileri kullanılmıştır.

# BÖLÜM 3

# MATERYAL VE METOD

## 3.1. Kenelerin Örneklenmesi ve Saklanması

Keneler, Edirne İli'ndeki belirlenen çalışma istasyonlarında (Şekil 3.1.) bulunan konak hayvanlar üzerinden pens kullanılarak örneklenmiştir. Kenelerin, +4 $^{o}$C ile +8 $^{o}$C arasındaki sıcaklıklarda 1-12 hafta canlılıklarını koruyabilmeleri nedeniyle, toplanan keneler, tür teşhisi yapılana kadar +4 $^{o}$C'de saklanmıştır. Çizelge 4.1.'de kenelerin örneklenmesi çalışmasındaki çalışma istasyonları, kene enfestasyonu yönünden muayene edilen hayvanlar ve örneklenen kenelerin türü/cinsi, cinsiyeti, evresi, sayısı verilmiştir.

## 3.2. Kenelerin Teşhisi

Kenelerin teşhisi, stereo mikroskop (Olympus SZ) ile teşhis anahtarları kullanılarak; literatürdeki morfolojik özelliklerine göre yapılmış; (Akdemir, 2001; Dantas-Torres vd., 2013; Gäumann, 2010; Güneş, 2002; Keskin, 2009; Özbay, 2010) teşhisi yapılan kenelerin stereo mikroskop ile uyumlu fotoğraf makinası (Olympus C-5060) ile fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).




**Şekil 3.1.** Kenelerin örneklenmesi çalışmasındaki çalışma istasyonları (Trakyanet, 2019)

### 3.3. Kene Ekstraktlarının Testler İçin Hazırlanması

Her havuzda tür, cinsiyet ve gelişim dönemi (larva, nimf, ergin) aynı olan kenelerin toplanması sağlanarak; keneler, 2-25 bireylik havuzlara ayrılmıştır. PBS (Phosphate-Buffered Saline) ile yıkandıktan sonra, havuzlarda kene başına 100 ul PBS olacak şekilde havanda ezilerek homojenize edilmiş, sonrasında örnekler, 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatantlar kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Böylece tüm kene ekstraktının hazırlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatantlar deneylerde kullanılmadan önce, 0,22 um por çaplı steril membran filtreden geçirilmiş; distile su ile seri dilusyonlarla hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki kene ekstraktları

(%0,31; %0,63; %1,25; %2,5; %3,13; %5; %6,25; %10; %12,5; %25; %50; %100'lük kene ekstraktı konsantrasyonları) çalışmalarda kullanılmıştır (de Abreu, 2014; Fikrig vd., 2004; Gürbüz Sarıgöl, 2007; Hekimoğlu, 2010; Hajnická vd., 2001; Kara, 2012; Kubes vd., 1994; Mulenga vd., 2000).

### 3.4. Hücre kültürleri

Çalışmalarımızda kullanılan HeLa (ATCC CCL-2) ve MEF [Mouse embryonic fibroblast (fare embriyonik fibroblast)] (ATCC SCRC-1040) hücre hatları, Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Hücreler, T-75 $cm^2$'lik flasklarda, DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium), Ham's F12 karışımı, EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), %10 FBS (Fetal Bovine Serum), 2 mM L-glutamine, %1 Penisilin- Streptomisin içeren 10 ml besiyeri içerisinde, %80-90 yoğunluğa ulaşınca pasajlanarak %5 $CO_2$'li 37 °C'deki etüvde steril şartlarda inkübe edilerek (Kayacan, 2015); MTT, Boyden Chamber ve Annexin V testlerinde kullanılmıştır.

#### 3.4.1. MTT (Metil Tiyazol Tetrazolyum) Testi

İlk kez Mossmann (1983) tarafından tanımlanan MTT testi, *in vitro* şartlarda hücre canlılığını ve sitotoksisitesini incelemek için kullanılan, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine dayanan kantitatif kolorimetrik bir testtir. Hücrelerin MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) indirgeyebilmesi, hücre canlılığının göstergesi olarak kabul edilmektedir ve test sonucunda tespit edilen boya yoğunluğu, canlı hücre sayısıyla orantılıdır (Dikmen, 2017; Kara, 2012). Çünkü mitokondriyal dehidrogenaz enzimi canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunmakta ve ölü hücreler bu işlemi yapamamaktadır (Nabizade, 2014). Test, canlı hücrelerdeki bu enzimin, sarı renkli MTT çözeltisini, tetrazolium halkasının kırılması sonucu suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürmesi ve meydana gelen renkli kristallerin DMSO ile çözülerek, çözeltinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Çelik, 2013; Uçbek, 2012).

Testte, farklı konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde uygulanmış *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların HeLa ve MEF hücrelerindeki olası antiproliferatif

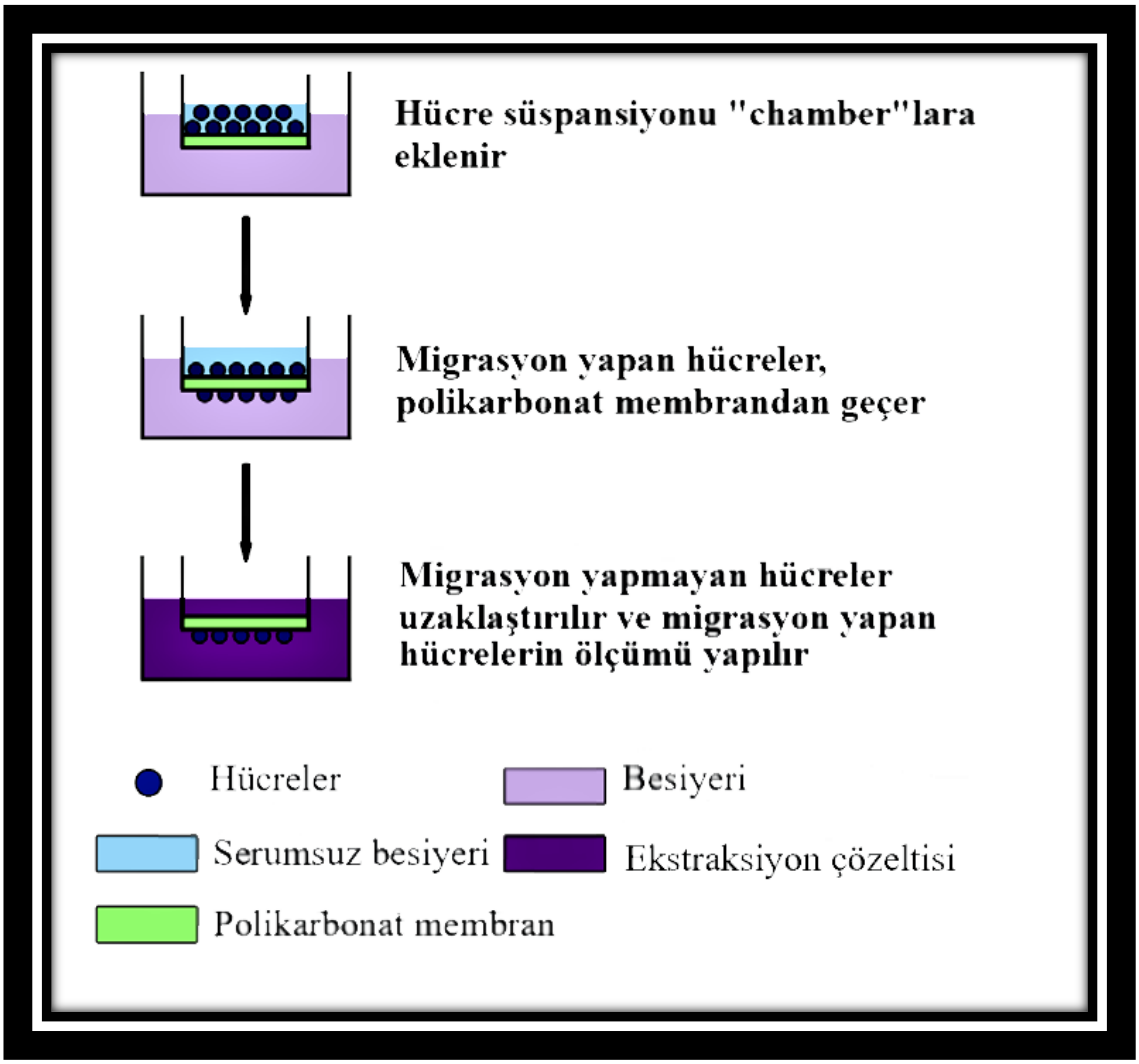
etkileri incelenmiştir. Çalışmada, 96'lik plak kuyucuklarının içerisine 180 µl hücre (0.1-1.0 x $10^6$ hücre/ml) ekimi yapılmış; 24 saatlik inkübasyondan sonra seri dilusyonlarla hazırlanan 20 µl *R. sanguineus* kene ekstraktları (%0,31; %0,63; %1,25; %2,5; %3,13; %5; %6,25; %10; %12,5; %25; %50; %100'lük kene ekstraktı konsantrasyonları) kuyucuklara ilave edilmiş; kene ekstraktı uygulanan hücre hatları 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır; ayrıca kene ekstraktlarını hazırlamada kullanılan PBS'in de etkileri kontrol edilmiştir). Sonrasında kuyucuklara, 20 µl MTT test solüsyonu (0.5 mg/mL) uygulanmış; 4 saat inkübasyondan sonra besiyeri boşaltılan kuyucuklara 200 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) ilave edilerek; mikroplak okuyucu (Thermo Fisher) ile 492 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Test, her hücre hattı için üç kez tekrarlanmış; sonuçların ortalamaları alınmış; deney hücrelerinin canlılık oranları, (test kuyucuğunun absorbansı/kontrol kuyucuğunun absorbansı) x 100 formülü kullanılarak % olarak hesaplanmış; IC50 değerleri (%50 baskılayıcı konsantrasyon) belirlenmiştir. IC50 değeri 48. saatte %100'lük konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Boyden Chamber ve Annexin V testinde de *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların 48. saatteki IC50 konsantrasyonuna göre çalışılmış ve 48 saatteki IC50 değeri olan %100'lük ve IC50/2 değeri %50'lik olan kene konsantrasyonları kullanılmıştır. Deney sonuçlarının istatistiksel olarak analiz edilmesi için, farklı konsantrasyonlardaki kene ekstraktları ile muamele edilmiş test grupları ve kontrol grubu IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) paket programı (Saenglee vd., 2016) kullanılarak karşılaştırılmış; analizlerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### 3.4.2. Boyden Chamber Testi

Hücre migrasyonunun *in vitro* ortamda test edilmesi için kullanılan yöntemlerden biri olan Boyden Chamber testinde, CytoSelect™ 24 Kuyucuklu Migrasyon Testi (8 µm, Kolorimetrik Format) kiti kullanılmıştır. Kitte, 8 um çapında polikarbonat membranı olan "migrasyon chamber"ları bulunmaktadır. "Chamberlar"daki bu membran tabakası, migrasyon yapan ve yapmayan hücrelerin ayrılmasında işlev görmektedir. Test,

“chamber”lardaki migrasyon yapan hücrelerin membrandan geçerken, migrasyon yapmayan hücrelerin geçememesi temeline dayanmaktadır (Avcı, 2015).

Testte, farklı konsantrasyonlarda uygulanmış *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların HeLa (insan servikal kanser hücreleri) ve MEF (fare embriyonik fibroblast) hücrelerinin migrasyonuna etkileri incelenmiştir. Çalışmada, 24 kuyucuklu plaklara “migrasyon chamber”ları konularak; “chamber”lara 300 uL, serumsuz ortamda hazırlanan, 48 saat, %100’lük (IC50 değerindeki konsantrasyon) ve %50’lik (IC50/2 değerindeki konsantrasyon) konsantrasyonlarındaki *R. sanguineus* kene ekstraktları ile muamele edilmiş HeLa ve MEF hücre süspansiyonu (0.5-1.0 x $10^6$ hücre/ml) eklenmiştir. Plakaların alt kuyucuklarına 500 uL serumlu besiyeri konmuş ve plaklar 24 saat inkübe edilmiştir (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır; ayrıca kene ekstraktlarını hazırlamada kullanılan PBS’in de etkileri kontrol edilmiştir). Sonrasında, “chamber”lardaki besiyeri dökülerek, swab yardımı ile, “chamber”ların iç kısmındaki membran tabakası yüzeyinde bulunan migrasyon yapmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, her bir boş chamber”a 200 uL ekstraksiyon çözeltisi eklenerek, 10 dk. inkübe edilip, her bir hücre hattına ait olan numuden 100 uL 96 kuyucuklu plaklara aktarılıp, plaka okuyucuda (Thermo Fisher) 560 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Şekil 3.2.). Test, her hücre hattı için üç kez tekrarlanmış; sonuçların ortalamaları alınmış; kene ekstraktlarının hücre migrasyonuna etkileri, (test kuyucuğunun absorbansı/kontrol kuyucuğunun absorbansı) x 100 formülü kullanılarak % olarak hesaplanmış; deney sonuçlarının istatistiksel olarak analiz edilmesi için, farklı konsantrasyonlardaki kene ekstraktları ile muamele edilmiş test grupları ve kontrol grubu IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) paket programı (Saenglee vd., 2016) kullanılarak karşılaştırılmış; analizlerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

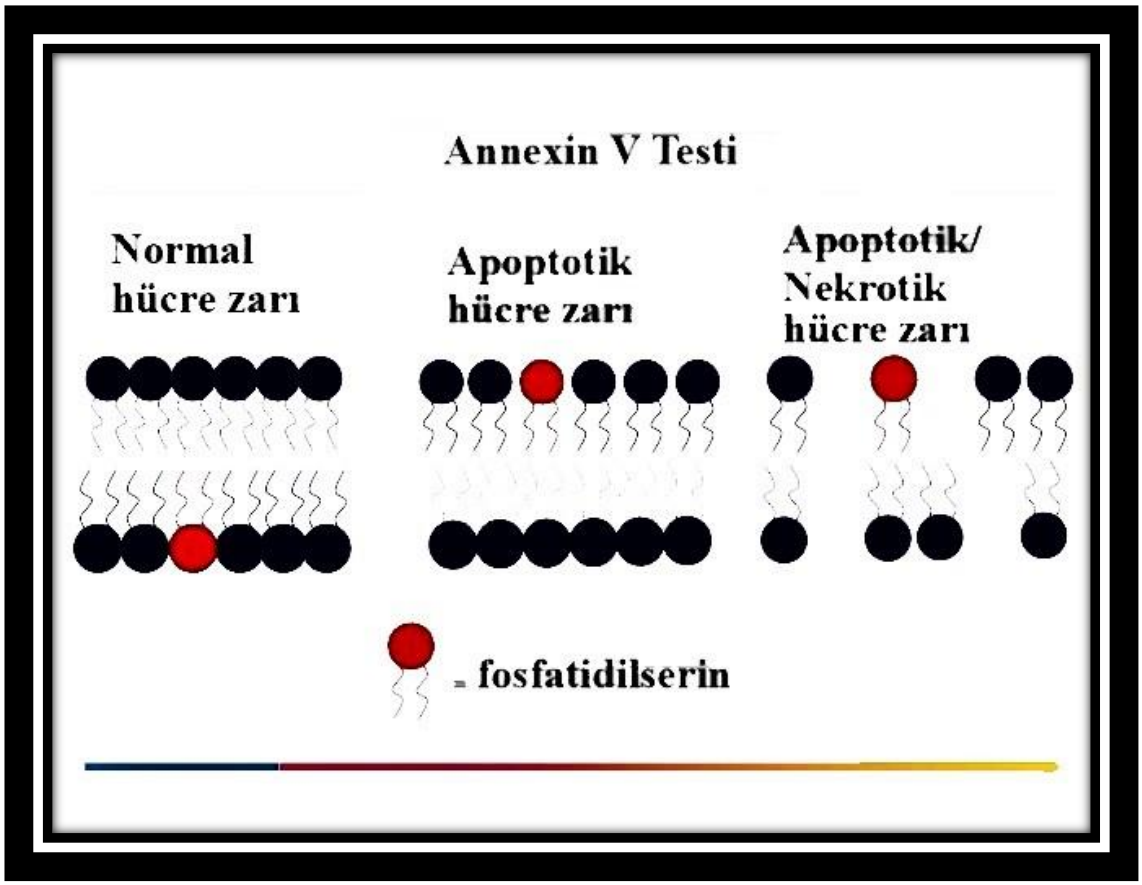



**Şekil 3.2.** Boyden chamber testi (Mybiosource, 2018)

### 3.4.3. Annexin V Testi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunurken; hücre apoptoza yöneldiği zaman normal koşullarda iç yüzeyde bulunan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne yerleşmektedir (Şekil 3.3.). Bu yer değişikliği işlemi hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde gerçekleşmektedir (Güleş ve Eren, 2008). Annexin V, hücrenin dış yüzeyine yerleşen fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir. Bu nedenle, floresan bir madde (Alexa Fluor gibi) ile işaretlenerek apoptotik hücrelerin görünmesi sağlanabilmektedir. Propidyum iyodür (PI) ise, DNA veya çift sarmallı RNA' ya bağlanır. Bu sayede, membran yapısı bozulmuş geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin

belirlenmesinde propidyum iyodürden yararlanılır. Annexin V Alexa Fluor (yeşil flouresans) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı flouresans) ile aynı anda boyanan hücreler, canlı hücreler (Annexin V-/PI-), erken apoptotik hücreler (Annexin V+/PI-), geç apoptotik veya nekrotik hücreler (Annexin V+/PI+) ve nekrotik hücrelerin (Annexin V-/PI+) birbirinden ayırt edilmesine olanak tanır (Dikmen, 2017; Güleş ve Eren, 2008).




**Şekil 3.3.** Annexin V testi (SlideShare, 2019)

Testte, farklı konsantrasyonlarda uygulanmış *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların HeLa ve MEF hücreleri üzerindeki olası apoptotik etkileri incelenmiştir. Kit olarak, Tali® Apoptosis Kit-Annexin V Alexa Fluor® 488 and Propidium Iodide kullanılmış; %100'lük (IC50 değerindeki konsantrasyon) ve %50'lik (IC50/2 değerindeki konsantrasyon) konsantrasyonlarındaki *R. sanguineus* kene ekstraktları ile 48 saat muamele edilmiş HeLa ve MEF hücreleri ile çalışılmıştır (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır).

Çalışmada, inkübasyon döneminden sonra hücreler santrifüjlenmiş; süpernatant atılmıştır. Kalan hücre pelleti, konsantre haldeki (5x) Annexin bağlama tamponunun (ABB) deiyonize su ile seyreltilmesiyle elde edilen 1x 100 µL Annexin bağlama tamponu (ABB) ile 5 x $10^5$-5 x $10^6$ hücre/ml olacak şekilde resuspanse edilerek üzerine 5 µL Annexin V Alexa Fluor® 488 ilave edilmiş; iyice karıştırılmış; oda sıcaklığında 20 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Hücreler, santrifüjlenip, 100 µL Annexin bağlama tamponu ile resuspanse edilerek üzerine 1 µL PI (propidyum iyodür) ilave edilmiş; iyice karıştırılmış; oda sıcaklığında ve karanlıkta 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 25 µL örnek, Tali® Image-Based Cytometer (Invitrogen) cihazına yüklenmiş; cihaz, örnekleri analiz edip analiz sonuçlarını ve otomatik olarak kaydettiği örnek görüntülerini vermiştir (Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.).

### 3.5. Ames Testi

Kanserin mutasyonların birikimi sonucu oluştuğu bilgisinin mevcut olduğu günümüzde, Ames testi, mutajenleri/kanserojenleri tespit etmede yaygın olarak tercih edilen kısa zamanlı, hassas genetik bir testtir (Çalık, 2013). *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar sonucu elde edilmiş oksotrofik mutantların kullanıldığı Ames testinde, *S. typhimurium* suşlarının histidin operonunda çeşitli genlerde farklı tipte mutasyonlar bulunmaktadır. Bu nedenle, çoğalmaları için gerekli histidin amino asidini sentezleme yeteneğini kaybetmiş olan bu oksotroflar, ortamda histidin bulunmadığında gelişip koloni oluşturamazlar. Test, oksotrof ($his^-$ = histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş) *Salmonella* suşlarının çoğunlukla kimyasal bir ajanla muamele edildikten sonra, ikinci bir mutasyon geçirip; prototrof ($his^+$ = yabani tip) haline dönmesi prensibine dayanır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000). Ayrıca, DNA onarım mekanizmasının zarar görmesi, bakteri hücre duvarının geçirgenliğinin arttırılması ve antibiyotik direnç geni içeren bir plasmidin hücreye sokulması gibi başka mutasyonlar da, testin çeşitli kimyasallara karşı hassasiyetinin arttırılması amacıyla, bu test suşlarında oluşturulmuştur (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

***S. typhimurium* TA98 suşu:** Ames testinde kullanılan test suşları histidin operonundaki genlerde mutasyonlar bulundurmaktadır. Bu test suşlarından çalışmamızda

kullandığımız *S. typhimurium* TA98'de, histidin sentezinden sorumlu son enzimi (histidinol dehidrogenaz) kodlayan hisD geninin –C-G-C-G-C-G-C-G dizisinin yakınındaki bir bazın ayrılmasıyla bir çerçeve kayması olmakta ve *hisD3052* mutasyonu olarak isimlendirilmektedir. Ames testinde kullanılan bütün suşlar gibi bu test suşunda da, lipopolisakkarit tabakanın yapımında işlev gören genlerde *rfa* mutasyonu bulunduğu için hücre duvarı hasarlıdır ve hücre duvarından normal şartlarda geçemeyecek büyüklükteki moleküller hücreye girip bakteri ölümüne yol açmaktadır. TA98 suşunun sahip olduğu diğer bir mutasyon da uvrB-bio genlerindedir. Delesyon tipinde olan *uvrB* mutasyonu hatasız kesip çıkarma onarım mekanizmasını engelleyip; hataya meyilli DNA onarım mekanizmasının çalışmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, biyotin vitamininin sentezinde görev alan bio geninde delesyon meydana geldiğinden, bu mutasyonun olduğu suşların üremesi için biyotin gereklidir. TA98 suşu aynı zamanda pKM101 plazmidi bulundurmaktadır. Bu plazmid, ampisilin direnç geni taşımaktadır ve hataya meyilli DNA onarım mekanizmasının uyarılmasında işlev görmektedir (Çizelge 3.1.) (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

**Çizelge 3.1.** *S. typhimurium* TA98 suşunun genetik özellikleri (Barış, 2007)

| **Mutasyonun niteliği** | ***LPS** | **R faktörü** | **Histidin mutasyonu** | **Onarım** | **Belirlenecek bileşik sınıfları** |
|---|---|---|---|---|---|
| CG yanından – 1 | *rfa* | pKM101 | *hisD3052* | ****Δuvr*B** | Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler |

***LPS: Lipopolisakkarit, **** *Δ*: Delesyon

Ames testi ile bu test için temin edilen *S. typhimurium* TA98 suşu kullanılarak, *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların olası mutajenik etkileri incelenmiştir. Ames mutajenite testi, Maron ve Ames (1983)'in geliştirdiği standart plak inkorporasyon yöntemine göre uygulanmıştır.

Çalışmada suşun istenilen genetik özelliklere yani orijinal mutasyonlara sahip olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Histidin gereksinimi kontrolünde; histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş mutant test suşunun, bu aminoasidin bulunmadığı MGA (Minimal Glukoz Agar) plaklarında üreyemediği, HB (Histidin/Biyotin) agar plaklarında üreyebildiği gözlemlenerek; histidin oksotrofu ($his^-$) olduğu kanıtlanmıştır. Bu kontrolde bu amaçla, HB (Histidin/Biyotin) agar ve bir miktar biyotin içeren MGA (Minimal Glukoz Agar) plakları kullanılarak; Nutrient broth (NB)'da üretilen 12-16 saatlik kültürden HB agar ve MGA plaklarına çizgi ekim yapılmış; plaklar, 37 ºC'de 48-72 saat inkübe edilmişlerdir. *Rfa* mutasyonu kontrolünde; suşun *rfa* geni taşıyıp taşımadığı kristal viyole hassasiyeti testi ile tespit edilmiştir. Kontrolde, 12-16 saatlik kültürü hazırlanan 100 µl *S. typhimurium* TA98 NA (Nutrient agar) plaklara ekilmiş; ticari olarak elde edilmiş 0,5 cm çaplı steril bir filtre diski plağın ortasına yerleştirilip; 10 µl %0,1'lik kristal viyole çözeltisi diske damlatılmıştır. Plaklar 37 ºC'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, disklerin etrafında yaklaşık 14 mm'lik şeffaf bir inhibisyon zonu gözlemlenmiş; normal şartlarda hücre duvarından geçemeyecek büyüklükteki kristal viyole boya moleküllerinin *rfa* mutasyonu *t*aşıyan bakteri hücresine geçmesi sonucu üremenin olmadığı şeffaf bir alan meydana gelmiştir (Ames vd., 1973). *uvrB* mutasyonu kontrolünde; UV hassasiyeti testi ile test suşunun *uvrB* mutasyonu taşıyıp taşımadığı tespit edilmiştir. Suşun gecelik kültüründen eküvyonla NA plağına paralel çizgilerle ekim yapılmış; petrinin kapağı açılıp yarısı bu paralel çizgileri kesecek şekilde plastik bir tabaka ile kapatılıp; plaklar, 8 sn boyunca 30 watt'lık UV lambası ile 33 cm yükseklikten muamele edilmiş ve 37 ºC'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, üremenin sadece UV ışınının alınmasının önlendiği yarı bölgede olduğu görülmüştür. Buradan test suşunun *uvrB* mutasyonu olduğu sonucuna varılmıştır (Ames vd., 1973). R faktörü kontolünde ise; test suşu HBA (Histidin/Biyotin/Ampisilin) plaklarına ekilerek; Ampisilin direnç faktörünü (R faktörü) içeren pKM101 olup olmadığını inecelemek için, 37 ºC'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve HBA (Histidin/Biyotin/Ampisilin) plaklarında üreme gösterdikleri için pKM101 plazmidini taşıdığı sonucuna varılmıştır.

Canlılığının ve genetik özelliklerinin uzun süre korunabilmesi için test suşu, -80 ºC'de saklanmıştır. Bu saklama işlemi için, genetik kontrolleri yapılarak HBA (Histidin/Biyotin/Ampisilin) plaklarına ekilen suştan iyi izole olmuş, normal büyüklüğe sahip bir koloni seçilip; 2 ml Nutrient broth'da 18 saatlik kültür hazırlanmış; suşun

ampisiline direnç özelliğinin kaybolmaması için, Nutrient broth içerisine ampisilin çözeltisinden (6,3 µl) ilave edilmiş; 37 ºC'de 12 saatlik inkübasyondan sonra, 0,1 ml DMSO (Dimetil sülfoksit) içeren steril eppendorf tüplerine bakteri kültüründen 0,9 ml eklenmiş ve suş -80 ºC'ye kaldırılmıştır. Çalışmalarda kullanılmak üzere, test suşunun stok kültürünün açılması işlemi için, -80 ºC'deki bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilmiş; öze yardımıyla ampisilin içeren Nutrient broth ortamına ekilen bakteriler, 37 ºC'de 12 saat inkübasyona bırakılmış; inkübasyon süresi sonunda, HBA (Histidin/Biyotin/Ampisilin) plaklarına paralel ekimleri yapılarak; 37 ºC'de 48 saat boyunca tekrar inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Bu plaklarda üreyen test suşundan iyi izole olmuş bir koloni kullanılarak 18 saatlik kültür hazırlandıktan sonra; 37 ºC'de 12 saat inkübe edilen Nutrient broth tüplerinden ekim yapılarak tekrar HBA (Histidin/Biyotin/Ampisilin) plakları elde edilmiştir.

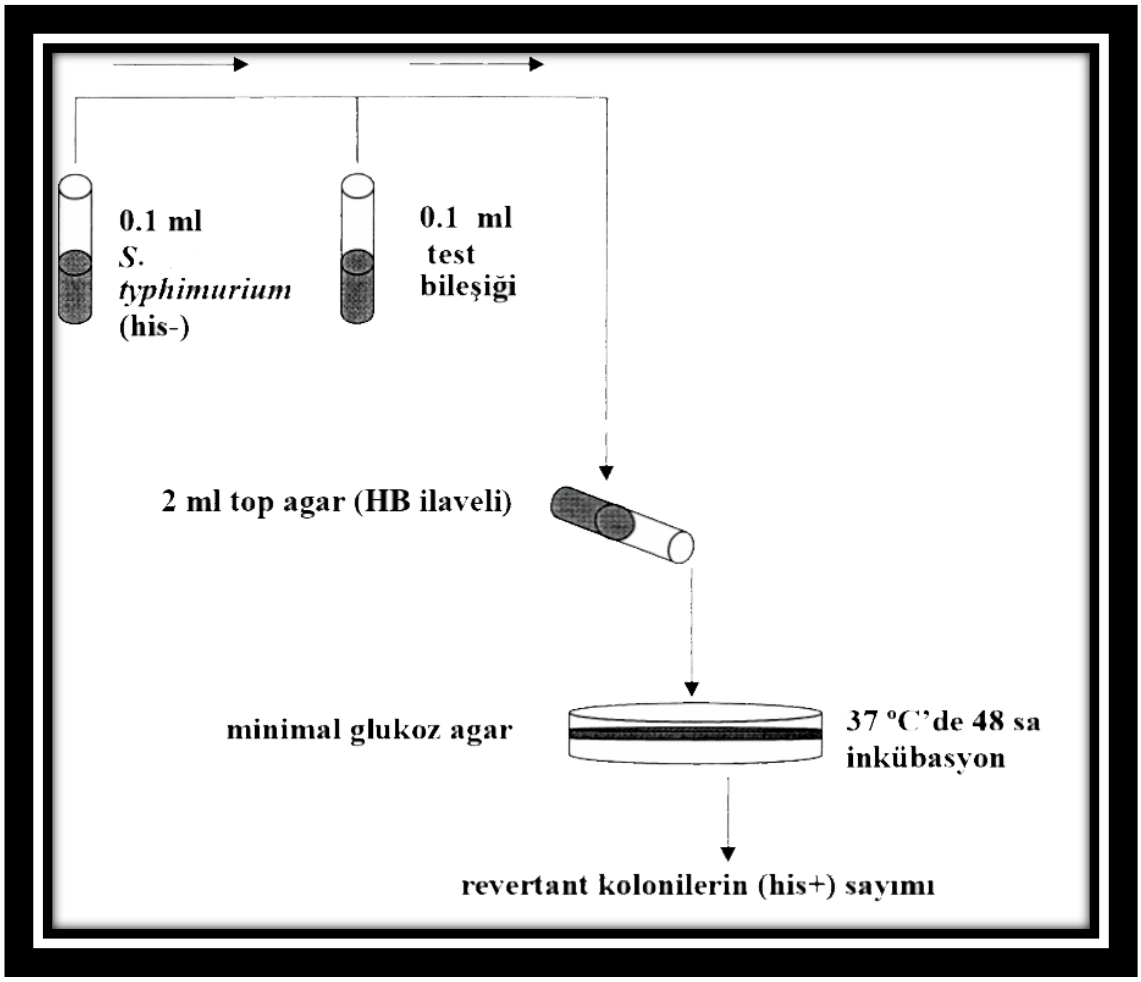
Test suşunun gecelik kültürünün hazırlanması için, genetik kontrolleri yapılarak hazırlanan HBA (Histidin/Biyotin/Ampisilin) plaklar ya da -80 ºC'deki kültürler kullanılmış; Nutrient broth ile hazırlanan kültüre, bir miktar (20 ml Nutrient broth için 63 µl) ampisilin çözeltisi eklenmiş; test suşu, 37 ºC'de 16 saat inkübe edilmiş; inkübasyon süresi sonunda elde edilen gecelik kültürden 0,5 ml taze besiyerine aktarılan bakteriler, 37 ºC'de 6 saat inkübasyona bırakılmışlardır (Akın, 2010). Testte kullanılan bu kültürlerin, yaklaşık 1-2 x $10^9$ koloni oluşturan birim (kob)/ml yoğunluğa sahip bakteri kültürleri olmaları sağlanmıştır.

Testte kullanılan gecelik sıvı kültürlerin mililitresinde bulunan bakteri miktarını tespit etmek için, spektrofotometre'de 540 nm dalga boyunda ölçümler yapılıp; (OD540 ~ 0,1-0,2) bu ölçümlere paralel ekimler gerçekleştirilmiştir. Bakteri yoğunluğunun seyreltilmesi için serum fizyolojik (%0,9 NaCl çözeltisi) kullanılarak; ekimler için bir dizi seyreltme ($10^{-1}$-$10^{-7}$) yapılmıştır. Sonrasında, her seyreltmeden 0,1 ml alınmak suretiyle 43 ºC'de tutulan 2 ml top agara eklenip karıştırılarak NA (Nutrient agar) plaklarına dökülmüş; plaklar 37 ºC'de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda sayılan kolonilerle aşağıda bulunan formül uygulanarak mililitredeki canlı bakteri sayısı belirlenmiştir.

1ml'de bulunan canlı hücre sayısı (kob/ml) = sulandırma faktörü x plaktaki koloni sayısı x 10

Standart plak inkorporasyon metodu esaslı Ames test ile *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların potansiyel mutajenik etkileri araştırılmıştır. Kenelere ait ekstraktların %0,31; %0,63; %1,25; %2,5; %3,13; %5; %6,25; %10; %12,5; %25; %50; %100'lük konsantrasyonları denenmiştir. Deneylerde, *S. typhimurium* TA98 suşu kullanılmış; çalışmalar metabolik aktivasyon yokluğunda (S9-) yapılmıştır. Testte, 43 ºC'deki 2 ml top agara (HB çözeltisi ilaveli) 100 µl kene ekstraktı ve 100 µl bakteri kültürü eklenip yavaşça karıştırılarak MGA plaklarına dökülmüş; bu plaklar 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakılmış; inkübasyon süresi sonunda geri dönen bakteri kolonileri ($his^+$ revertantlar) sayılmıştır (Şekil 3.4.). Test, her kene ekstraktı konsantrasyonu için üç kez tekrarlanmış; deney sonuçları student t testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Deney çalışmalarına eş zamanlı paralel pozitif, negatif ve spontan kontroller yapılmıştır. Pozitif kontrol için; standart mutajen olarak NPD (4-nitro-o-fenilendiamin (NPD) (10 µg/plak) kullanılmıştır. Bu kontrolde, 43 ºC'deki 2 ml top agara (HB çözeltisi ilaveli) 100 µl NPD (4-nitro-o-fenilendiamin) ve 100 µl bakteri kültürü ilave edilmiş; karıştırılıp MGA plaklarına dökülmüş; pu plaklar 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda geri dönen bakteri kolonileri ($his^+$ revertantlar) sayılmıştır. Negatif kontrolde, geriye dönen ($his^+$) bakteri sayısı üzerine bir etkilerinin olup olmadığını tespit etmek için, standart mutajeni çözmek için kullanılan DMSO (Dimetil sülfoksit) ve kene ekstraktlarını hazırlamada kullanılan PBS (Phosphate-Buffered Saline) kullanılmıştır. Bu kontrolde 43 ºC'deki 2 ml top agara (HB çözeltisi ilaveli) 100 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) veya PBS (Phosphate-Buffered Saline), 100 µl bakteri kültürü eklendikten sonra karıştırılarak MGA plaklarına dökülmüştür. Bu plaklar 37 ºC'de 48 saat inkübe edildikten sonra, geri dönen bakteri kolonileri ($his^+$ revertantlar) sayılmıştır. TA98 suşu için 20-50 revertant/plak olmak üzere, $his^-$ *S. typhimurium* TA98 suşu belirli sınırlar içerisinde kendiliğinden (spontan) $his^+$ hale gelebilmektedir (Mortelmans ve Zeiger, 2000). Spontan kontrolde, 43 ºC'deki 2 ml top agara (HB çözeltisi ilaveli) 100 µl bakteri kültürü eklenerek yavaşça karıştırılıp MGA plaklarına döküldükten sonra; bu plaklar 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakılmış; inkübasyon sonunda geri dönen bakteri kolonilerinin ($his^+$ revertantlar) sayısı tespit edilmiştir.




**Şekil 3.4.** Standart plak inkorporasyon testi (Mortelmans ve Zeiger, 2000)

Testte, kene ekstraktlarının mutajenik etkisinin sahip olup olmadığını tespit etmek için deney grupları negatif kontrollerle karşılaştırılmıştır. Mutajenik bir etkisi olduğunu söyleyebilmek için, ekstrakt muamelesi sonucu üremiş geri dönen (revertant) koloni sayısının negatif kontrole oranla iki katı olması gerekmektedir. Eğer doza bağlı koloni sayısı artışı gözlemleniyorsa, zayıf mutajenik aktivitesinin olması söz konusudur (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

### 3.6. Disk Difüzyon Testi

Antibiyotik duyarlılığının tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan ve Kirby-Bauer tarafından geliştirilen Disk difüzyon testi, filtre kâğıdı disklerine emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı incelenen organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması prensibine

dayanmaktadır. Testte, belirli miktarda antibiyotik emdirilmiş kâğıt diskler, araştırılacak mikroorganizmanın inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir; antibiyotik katı besiyerine doğru difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizma da üremeye başlar. Ancak, inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, antibiyotiğin inhibitör konsantrasyonları nedeniyle diskin çevresinde üreme gözlemlenmez. Mikroorganizma antibiyotiğe ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş çaplı olmaktadır. Testte, inhibisyon zonunun çapı mm olarak ölçülerek; standart inhibisyon zonu tablolarına göre mikroorganizmanın test edilen antimikrobik maddelere karşı duyarlılığı tespit edilir (Başyemenici, 2012).

Testte, *S. entomophila* ATCC 43705, *B. thuringiensis* ATCC 33679, *B. cereus*, *S. typhimurium* ATCC 13311, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. typhimurium* TA98, *E. coli* OP50, *P. mirabilis* bakterileri kullanılarak, *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların olası antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Besiyeri olarak Mueller Hinton Agar, kene ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerini incelenmek için, Mueller Hinton Broth da bakteri kültürlerini aktifleştirmek için kullanılmıştır. Bu aktifleştirmede, stok kültürlerden alınan bakterilerin her biri 5 ml Mueller Hinton Broth'a inoküle edilerek, 37 °C'de etüvde 16-18 saat inkübe edilmiş; inkübasyon süresi sonunda bakteri süspansiyonlarının 0.5 McFarland standart tüpüne göre steril serum fizyolojik ile ayarlaması yapıldıktan sonra, süspansiyonlar, Mueller Hinton Agar içeren petrilere 0.1'şer ml olarak dağıtılmıştır. Sonrasında, aseptik olarak *R. sanguineus* kene ekstraktları (%0,31; %0,63; %1,25; %2,5; %3,13; %5; %6,25; %10; %12,5; %25; %50; %100'lük kene ekstraktı konsantrasyonları) emdirilmiş 6mm çapındaki diskler, petrilere yerleştirilmiştir. Petrilere kene ekstraktı içeren diskin yanı sıra, kene ekstraktı içermeyen, ekstraktı hazırlamada kullanılan PBS (Phosphate Buffered Saline)'in emdirildiği disk negatif kontrol; ampisilin antibiyotiğinin emdirildiği disk de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Sadece, *S. typhimurium* TA98 için, ampisiline dirençli olması nedeniyle, pozitif kontrol olarak siprofloksasin kullanılmıştır). Daha sonra, bakterilerin inoküle edildiği petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş; test, her kene ekstraktı konsantrasyonu için üç kez tekrarlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, disklerin çevresinde inhibisyon zonlarının oluşmadığı gözlemlenmiş; böylelikle *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların test edilen mikroorganizmalarda antimikrobiyal etkileri görülmemiştir.

# BÖLÜM 4

# SONUÇLAR

## 4.1. Kenelerin Örneklenmesi ve Dağılımları

**Çizelge 4.1.** Kenelerin örneklenmesi çalışmasındaki çalışma istasyonları, kene enfestasyonu yönünden muayene edilen hayvanlar ve örneklenen kenelerin türü/cinsi, cinsiyeti, gelişim evresi, sayısı

| No | Çalışma istasyonları | Kene enfestasyonu yönünden muayene edilen hayvanlar | Örneklenen kenelerin türü, cinsiyeti, gelişim evresi, sayısı |
|---|---|---|---|
| 1 | Edirne İli Merkez İlçesi Karakasım Köyü-Doyran Köyü-Tayakadın Köyü | Küçükbaş hayvanlar (koyun, koç, keçi, teke) | *- |
| 2 | Edirne İli Merkez İlçesi Karakasım Köyü-Doyran Köyü-Tayakadın Köyü | Köpekler | 7 tane, erişkin, dişi *R. sanguineus* |
| 3 | Edirne İli Merkez İlçesi Yeniimaret Mahallesi | Küçükbaş hayvanlar (koyun, koç, keçi, teke) | - |
| 4 | Edirne İli Merkez İlçesi Yeniimaret Mahallesi | Köpekler | 2 tane, erişkin, dişi *R. sanguineus* |
| 5 | Edirne İli Merkez İlçesi Karaağaç Mahallesi | Köpekler | 11 tane, erişkin, dişi *R. sanguineus* |

**Çizelge 4.1.** (devamı) Kenelerin örneklenmesi çalışmasındaki çalışma istasyonları, kene enfestasyonu yönünden muayene edilen hayvanlar ve örneklenen kenelerin türü/cinsi, cinsiyeti, gelişim evresi, sayısı

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6 | Edirne İli Merkez İlçesi Karaağaç Mahallesi | Büyükbaş hayvanlar (sığırlar) | - |
| 7 | Edirne İli Merkez İlçesi Karaağaç Mahallesi | Küçükbaş hayvanlar (koyun, koç, keçi, teke) | - |
| 8 | Edirne İli Merkez İlçesi | Köpekler | 100 tane, erişkin, dişi *R. sanguineus* |
| 9 | Edirne İli Merkez İlçesi Çavuşbey Mahallesi | Köpekler | 8 tane, erişkin, dişi *R. sanguineus* |
| 10 | Edirne İli Merkez İlçesi Çavuşbey Mahallesi | Büyükbaş hayvanlar (sığırlar), kaplumbağalar | 39 tane, erişkin, *Hyalomma* sp. |
| 11 | Edirne İli Merkez İlçesi Büyükdöllük Köyü | Köpekler | 11 tane, erişkin, dişi *R. sanguineus* |
| 12 | Edirne İli Merkez İlçesi Büyükdöllük Köyü | Köpekler | 28 tane, erişkin, dişi *R. sanguineus* |
| 13 | Edirne İli Merkez İlçesi Küçükdöllük Köyü | Köpekler | 1 tane, erişkin, dişi *R. sanguineus* |

Çalışmalarımızda, 168'i dişi *R. sanguineus* olmak üzere toplam 207 kene toplanmıştır (Çizelge 4.1.).

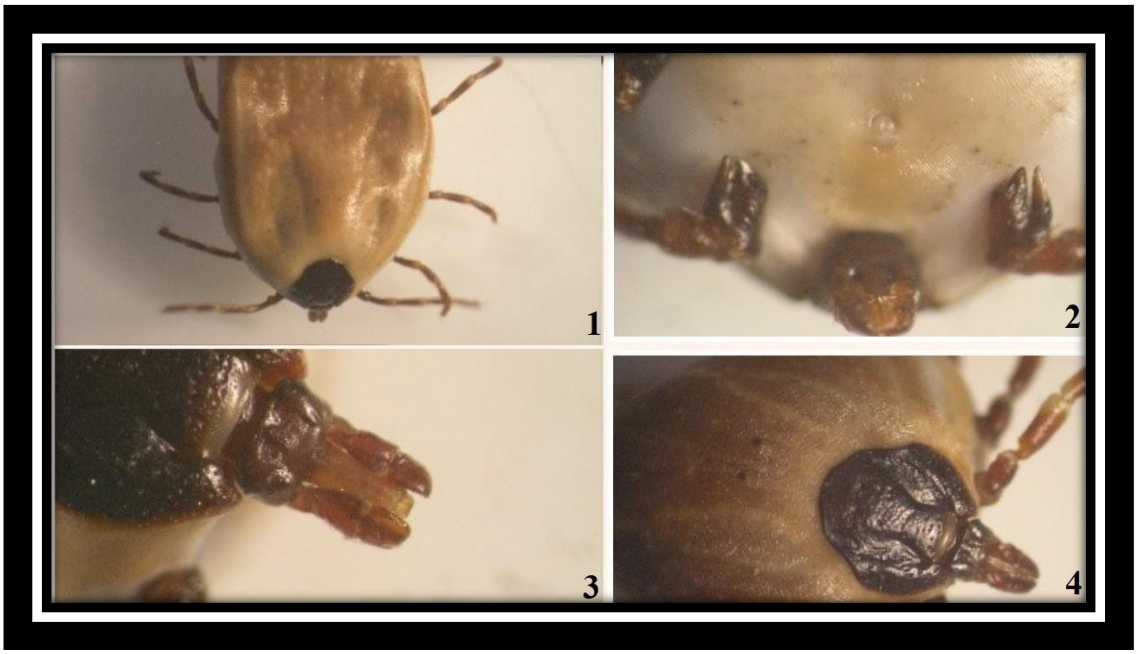
***-** : 1, 3, 6 ve 7 nolu çalışma istasyonlarında hayvanlara ilaç uygulanması nedeniyle keneye rastlanmamıştır (Çizelge 4.1.).



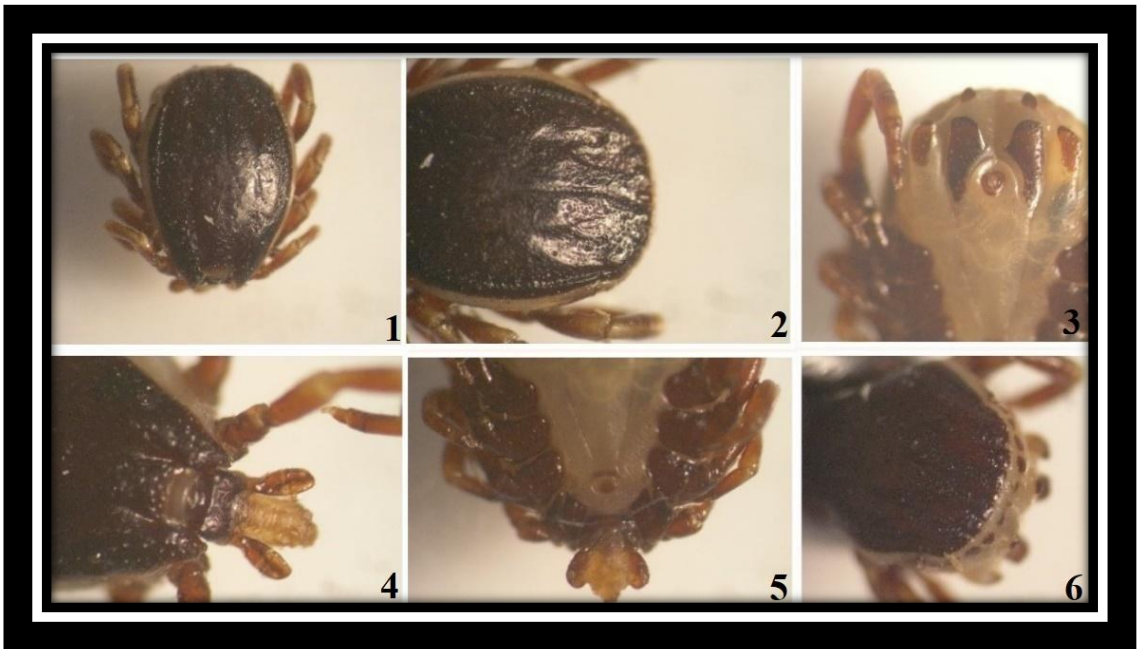

**Şekil 4.1.** Örneklenen dişi *R. sanguineus* kenelerine ait fotoğraflar [1: (10x); 2: (10x); 3: (40x); 4: (40x); 5: (40x)]




**Şekil 4.2.** Örneklenen *Hyalomma* sp. cinsine ait fotoğraflar [1: (10x); 2: (10x); 3: (40x)]



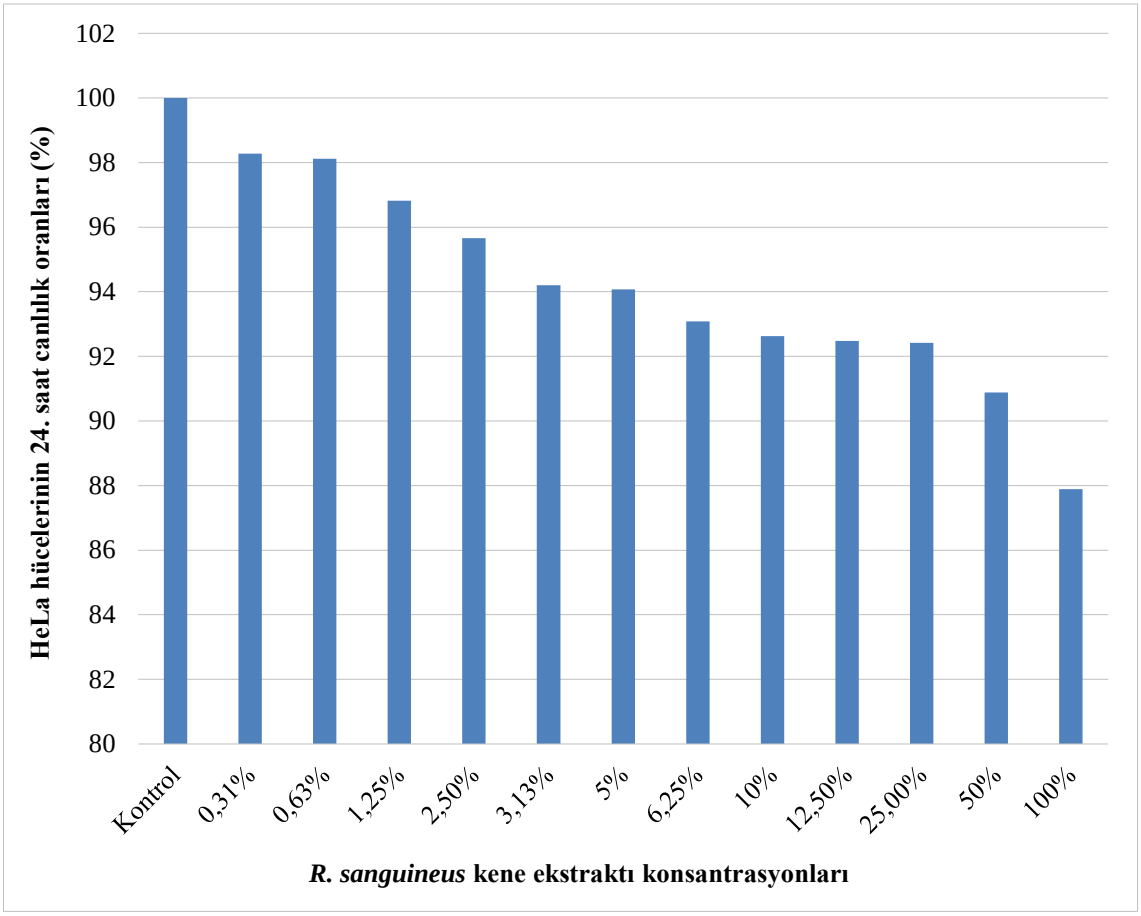

**Şekil 4.3.** Örneklenen *Hyalomma* sp. cinsine ait fotoğraflar [1: (20x); 2: (60x); 3: (60x); 4: (40x)]




**Şekil 4.4.** Örneklenen *Hyalomma* sp. cinsine ait fotoğraflar [1: (10x); 2: (40x); 3: (40x); 4: (40x); 5: (40x)]

## 4.2. Hücre kültürlerine *R. sanguineus* kene ekstraktlarının etkileri

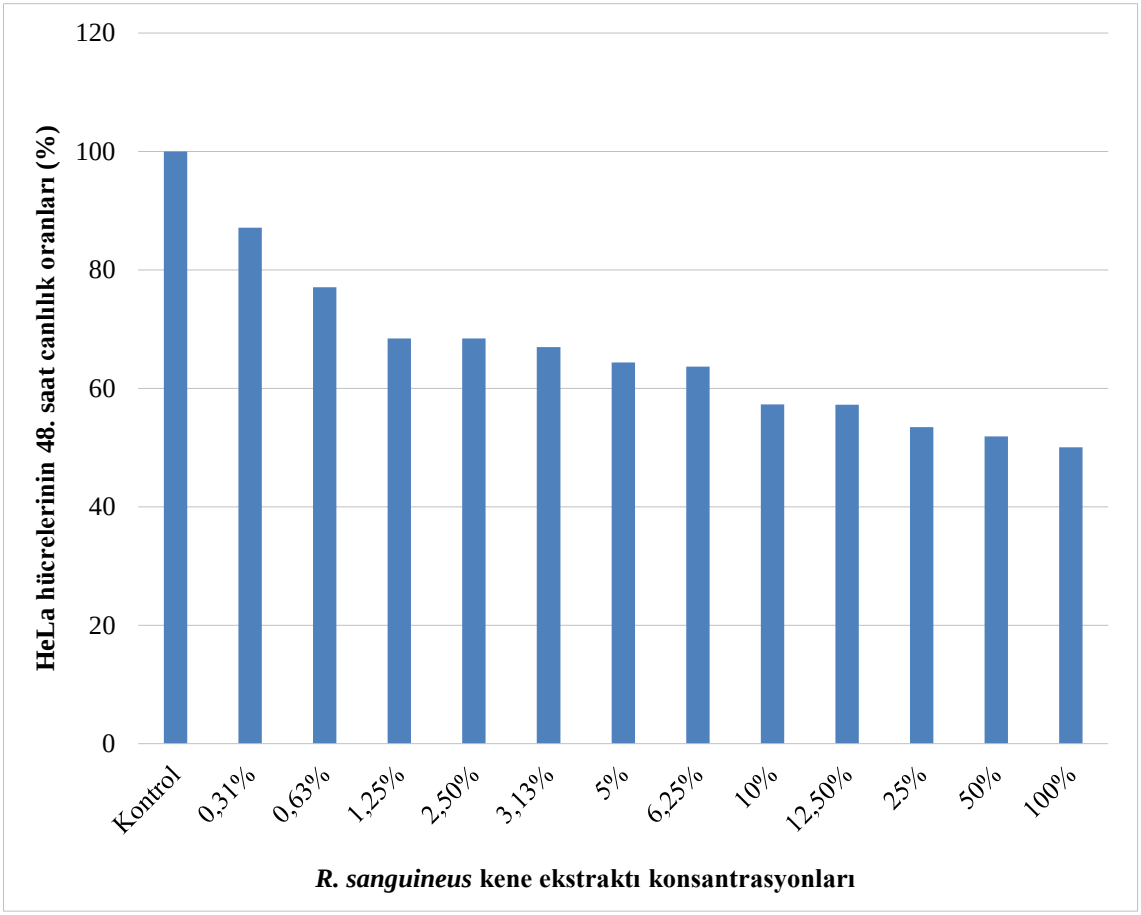
### 4.2.1. MTT (Metil Tiyazol Tetrazolyum) Testi




**Şekil 4.5.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen MTT testi absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılık grafiği (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

**Çizelge 4.2.** HeLa hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve HeLa hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki MTT testi absorbans sonuçlarına göre ortalama canlılık oranı (%) ve standart sapma değerleri (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

| Uygulanan kene ekstraktı konsantrasyonları | Ortalama canlılık oranı (%) | Standart sapma |
|---|---|---|
| Kontrol | 100 | 0,059 |
| %0,31 | 98,275 | 0,134 |
| %0,63 | 98,118 | 0,130 |
| %1,25 | 96,822 | 0,151 |
| %2,50 | 95,661 | 0,072 |
| %3,13 | 94,201 | 0,061 |
| %5 | 94,076 | 0,044 |
| %6,25 | 93,082 | 0,091 |
| %10 | 92,625 | 0,066 |
| %12,50 | 92,478 | 0,126 |
| %25 | 92,414 | 0,130 |
| %50 | 90,884 | 0,092 |
| %100 | 87,890 | 0,027 |



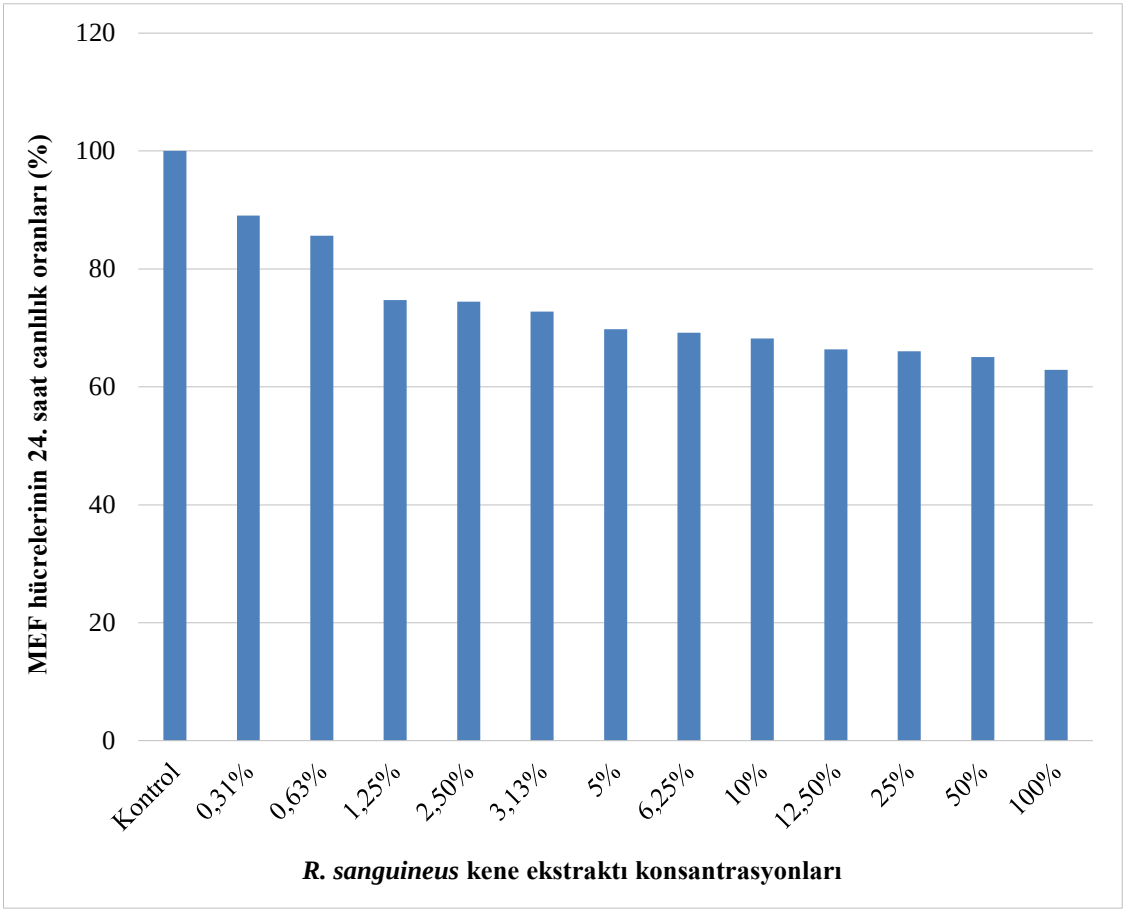

**Şekil 4.6.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının HeLa hücre hattı canlılığı üzerindeki 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen MTT testi absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılık grafiği (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

**Çizelge 4.3**. HeLa hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve HeLa hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki MTT testi absorbans sonuçlarına göre ortalama canlılık oranı (%) ve standart sapma değerleri (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

| Uygulanan kene ekstraktı konsantrasyonları | Ortalama canlılık oranı (%) | Standart sapma |
|---|---|---|
| Kontrol | 100 | 0,092 |
| %0,31 | 87,129 | 0,242 |
| %0,63 | 77,060 | 0,104 |
| %1,25 | 68,438 | 0,075 |
| %2,50 | 68,401 | 0,071 |
| %3,13 | 66,976 | 0,068 |
| %5 | 64,351 | 0,056 |
| %6,25 | 63,690 | 0,043 |
| %10 | 57,307 | 0,055 |
| %12,50 | 57,209 | 0,026 |
| %25 | 53,430 | 0,029 |
| %50 | 51,889 | 0,018 |
| %100 | 50,037 | 0,039 |

*R. sanguineus* kenelerine ait ekstrakt konsantrasyonlarının HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisinin MTT testi ile belirlenmesinde, deney sonuçlarının IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) paket programında değerlendirilmesi sonucunda, %25, %50 ve %100'lük konsantrasyonlardaki canlılık oranları kontrol grubundan anlamlı derecede farklı ve küçük bulunmuştur ($p<0,05$). 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise, %0,31'lük konsantrasyon hariç tüm konsantrasyonlardaki canlılık oranları kontrol grubundan anlamlı derecede farklı ve küçük bulunmuştur ($p<0,05$). IC50 değeri 48. saatte %100'lük konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Boyden Chamber ve Annexin V testinde de *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların 48.saatteki IC50 konsantrasyonuna göre çalışılmış ve 48 saatteki IC50 değeri olan %100'lük konsantrasyon kullanılmıştır. *R. sanguineus* kene ekstraktlarının, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki HeLa hücrelerinin

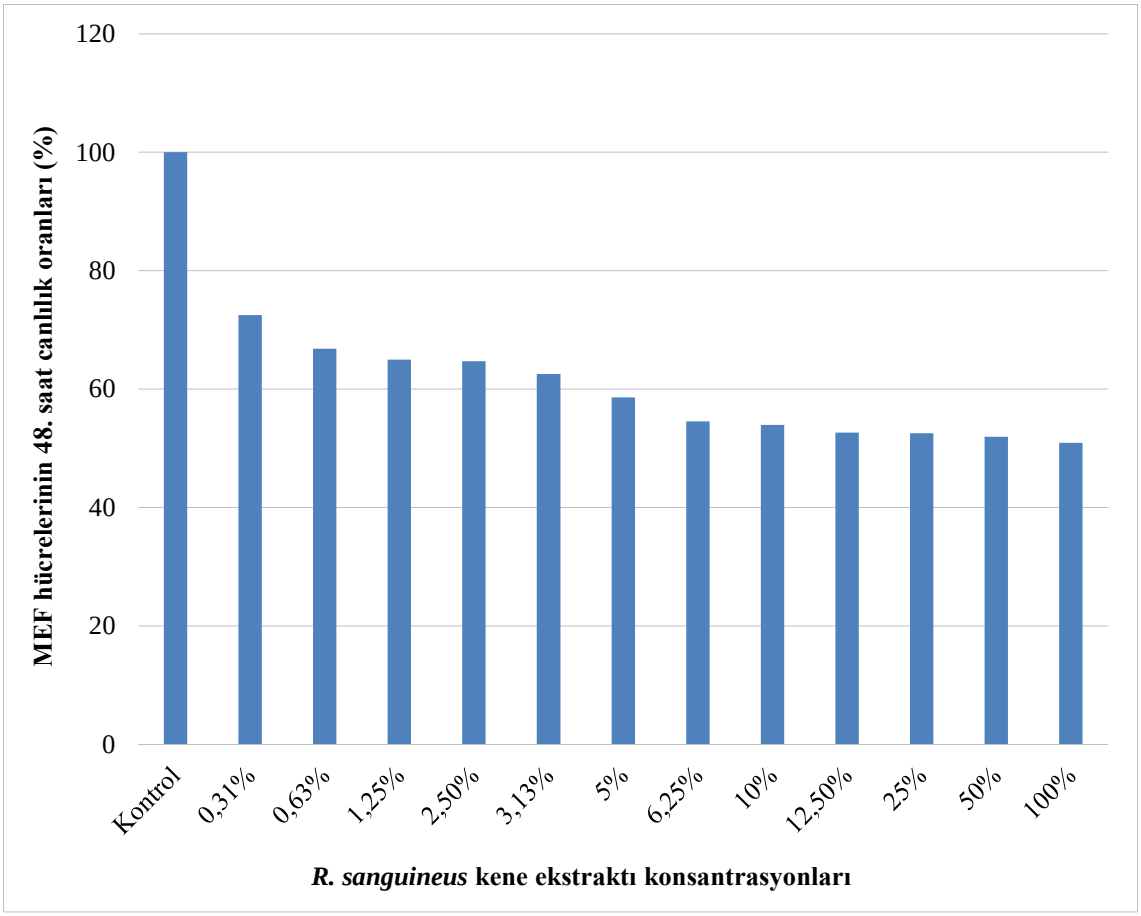
canlılığında, uygulanan konsantrasyon ve inkübasyon süresi arttıkça azalmaya neden olduğu; ancak en yüksek konsantrasyonlardaki kene ekstraktları ile muamele edilen hücre kültürlerinde dahi %100 ölümün görülmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.5., Çizelge 4.2.; Şekil 4.6., Çizelge 4.3.).




**Şekil 4.7.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının MEF hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen MTT testi absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılık grafiği (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

**Çizelge 4.4.** MEF hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve MEF hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki MTT testi absorbans sonuçlarına göre ortalama canlılık oranı (%) ve standart sapma değerleri (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

| Uygulanan kene ekstraktı konsantrasyonları | Ortalama canlılık oranı (%) | Standart sapma |
|---|---|---|
| Kontrol | 100 | 0,049 |
| %0,31 | 89,059 | 0,064 |
| %0,63 | 85,662 | 0,141 |
| %1,25 | 74,704 | 0,100 |
| %2,50 | 74,455 | 0,082 |
| %3,13 | 72,748 | 0,064 |
| %5 | 69,78 | 0,144 |
| %6,25 | 69,207 | 0,141 |
| %10 | 68,215 | 0,089 |
| %12,50 | 66,363 | 0,100 |
| %25 | 66,051 | 0,082 |
| %50 | 65,045 | 0,144 |
| %100 | 62,892 | 0,089 |




**Şekil 4.8.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının MEF hücrelerinin canlılığı üzerindeki 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen MTT testi absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılık grafiği (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

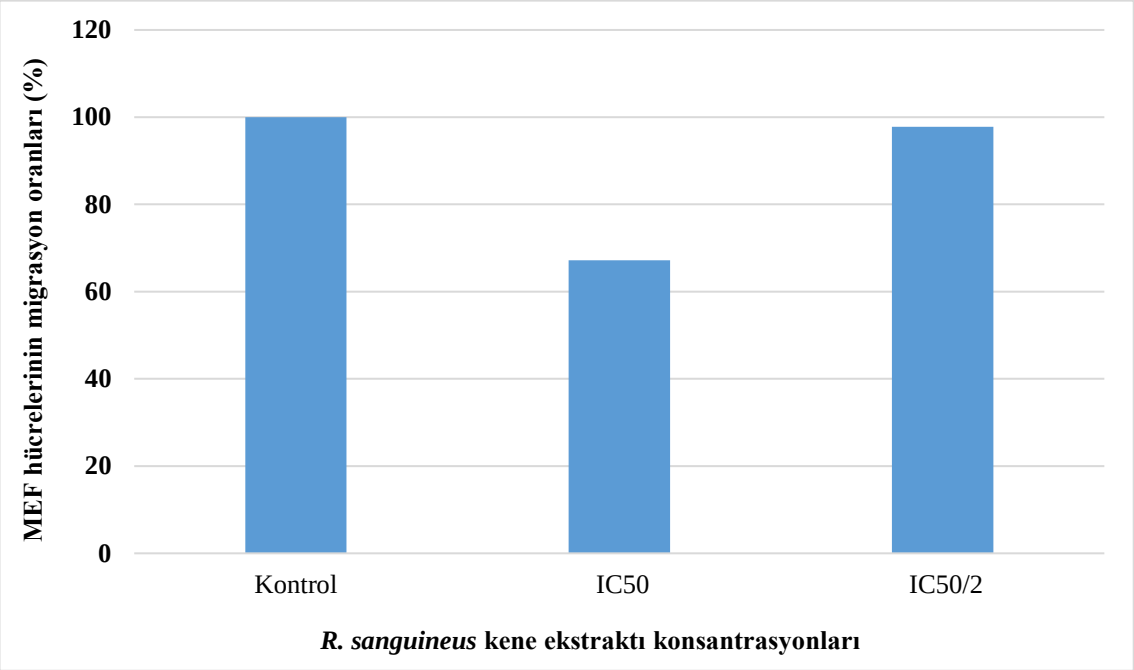
**Çizelge 4.5.** MEF hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve MEF hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki MTT testi absorbans sonuçlarına göre ortalama canlılık oranı (%) ve standart sapma değerleri (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

| Uygulanan kene ekstraktı konsantrasyonları | Ortalama canlılık oranı (%) | Standart sapma |
|---|---|---|
| Kontrol | 100 | 0,047 |
| %0,31 | 72,516 | 0,080 |
| %0,63 | 66,840 | 0,265 |
| %1,25 | 65,002 | 0,065 |
| %2,50 | 64,730 | 0,084 |
| %3,13 | 62,557 | 0,047 |
| %5 | 58,590 | 0,035 |
| %6,25 | 54,570 | 0,313 |
| %10 | 53,939 | 0,047 |
| %12,50 | 52,644 | 0,032 |
| %25 | 52,533 | 0,019 |
| %50 | 51,976 | 0,016 |
| %100 | 50,929 | 0,044 |

*R. sanguineus* kenelerine ait ekstrakt konsantrasyonlarının MEF hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisinin MTT testi ile belirlenmesinde, deney sonuçlarının IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) paket programında değerlendirilmesi sonucunda, %25, %50 ve %100'lük konsantrasyonlardaki canlılık oranları kontrol grubundan anlamlı derecede farklı ve küçük bulunmuştur ($p<0,05$). 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise, %0,31 ve %0,63'lük konsantrasyonlar hariç tüm konsantrasyonlardaki canlılık oranları kontrol grubundan

anlamlı derecede farklı ve küçük bulunmuştur ($p<0,05$). IC50 değeri 48. saatte %100'lük kene ekstraktı konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Boyden Chamber ve Annexin V testinde de *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların 48.saatteki IC50 konsantrasyonuna göre çalışılmış ve 48. saatteki IC50 değeri olan %100'lük konsantrasyon kullanılmıştır. *R. sanguineus* kene ekstraktlarının, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki MEF hücrelerinin canlılığında, uygulanan konsantrasyon ve inkübasyon süresi arttıkça azalmaya neden olduğu; ancak en yüksek konsantrasyonlardaki kene ekstraktları ile muamele edilen hücre kültürlerinde dahi %100 ölümün görülmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.7., Çizelge 4.4.; Şekil 4.8., Çizelge 4.5.). HeLa ve MEF hücreleri, MTT testi absorbans sonuçlarına göre, aynı inkübasyon süresi ve ekstrakt konsantrasyonu için ortalama canlılık oranı bakımımdan karşılaştırıldığında; HeLa hücrelerinin ortalama canlılık oranı, 24 saatlik inkübasyon sonrasında, %100 'lük konsantrasyon (IC50 konsantrasyonu) için %87,890; %50 'lik konsantrasyon (IC50/2 konsantrasyonu) için %90,884; 48 saatlik inkübasyon sonrasında, %100 'lük konsantrasyon (IC50 konsantrasyonu) için %50,037; %50 'lik konsantrasyon (IC50/2 konsantrasyonu) için %51,889 dur. MEF hücrelerinin ortalama canlılık oranı ise, 24 saatlik inkübasyon sonrasında, %100 'lük konsantrasyon (IC50 konsantrasyonu) için %62,892; %50 'lik konsantrasyon (IC50/2 konsantrasyonu) için %65,045; 48 saatlik inkübasyon sonrasında, %100 'lük konsantrasyon (IC50 konsantrasyonu) için %50,929; %50 'lik konsantrasyon (IC50/2 konsantrasyonu) için %51,976 dır. Sonuç olarak, hücre hatlarının kene ekstraktı konsantrasyonları ile muamele edilmesi ile, inkübasyon süresinin ilk 24 saatinde aynı konsantrasyonlarda MEF hücrelerinin canlılığındaki azalma daha hızlı olduğu için, bu hücrelerin duyarlılığının HeLa hücrelerine göre daha yüksek olduğu; ancak 48 saatlik inkübasyon sonunda canlılık oranlarının iki hücre hattı için yakın değerlerde bulunduğu gösterilmiştir.

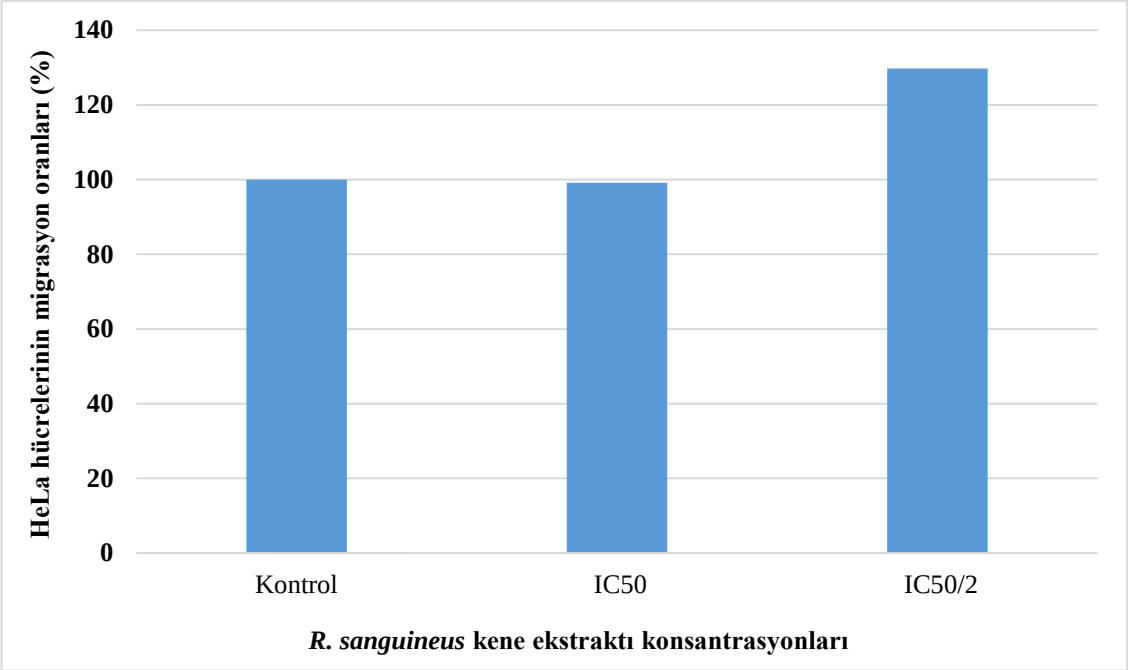
### 4.2.2. Boyden Chamber Testi




**Şekil 4.9.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının MEF hücrelerinin migrasyonu üzerindeki 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen Boyden Chamber testi absorbans sonuçlarına göre % hücre migrasyon grafiği (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

**Çizelge 4.6**. MEF hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve MEF hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında, Boyden Chamber testi absorbans sonuçlarına göre ortalama migrasyon oranı (%) ve standart sapma değerleri (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

| Uygulanan kene ekstraktı konsantrasyonları | Ortalama migrasyon oranı (%) | Standart sapma |
|---|---|---|
| Kontrol | 100 | 0,43 |
| IC50 konsantrasyonu | 67,202 | 0,43 |
| IC50/2 konsantrasyonu | 97,816 | 0,43 |




**Şekil 4.10.** *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının HeLa hücrelerinin migrasyonu üzerindeki 48 saatlik inkübasyon sonrasındaki etkisiyle elde edilen Boyden Chamber testi absorbans sonuçlarına göre % hücre migrasyon grafiği (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

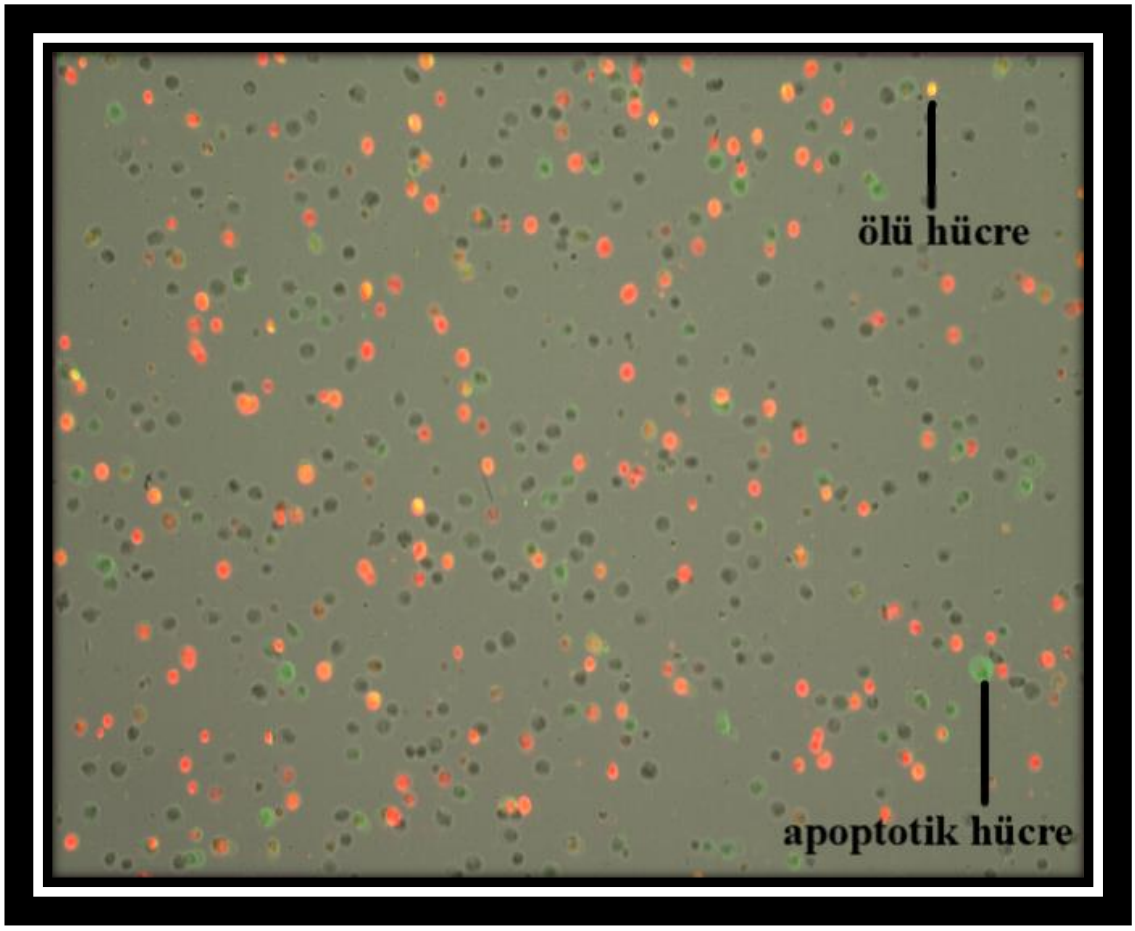
**Çizelge 4.7.** HeLa hücrelerine uygulanan *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonları ve HeLa hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında, Boyden Chamber testi absorbans sonuçlarına göre ortalama migrasyon oranı (%) ve standart sapma değerleri (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

| Uygulanan kene ekstraktı konsantrasyonları | Ortalama migrasyon oranı (%) | Standart sapma |
|---|---|---|
| Kontrol | 100 | 0,21 |
| IC50 konsantrasyonu | 99,185 | 0,35 |
| IC50/2 konsantrasyonu | 129,767 | 0,45 |

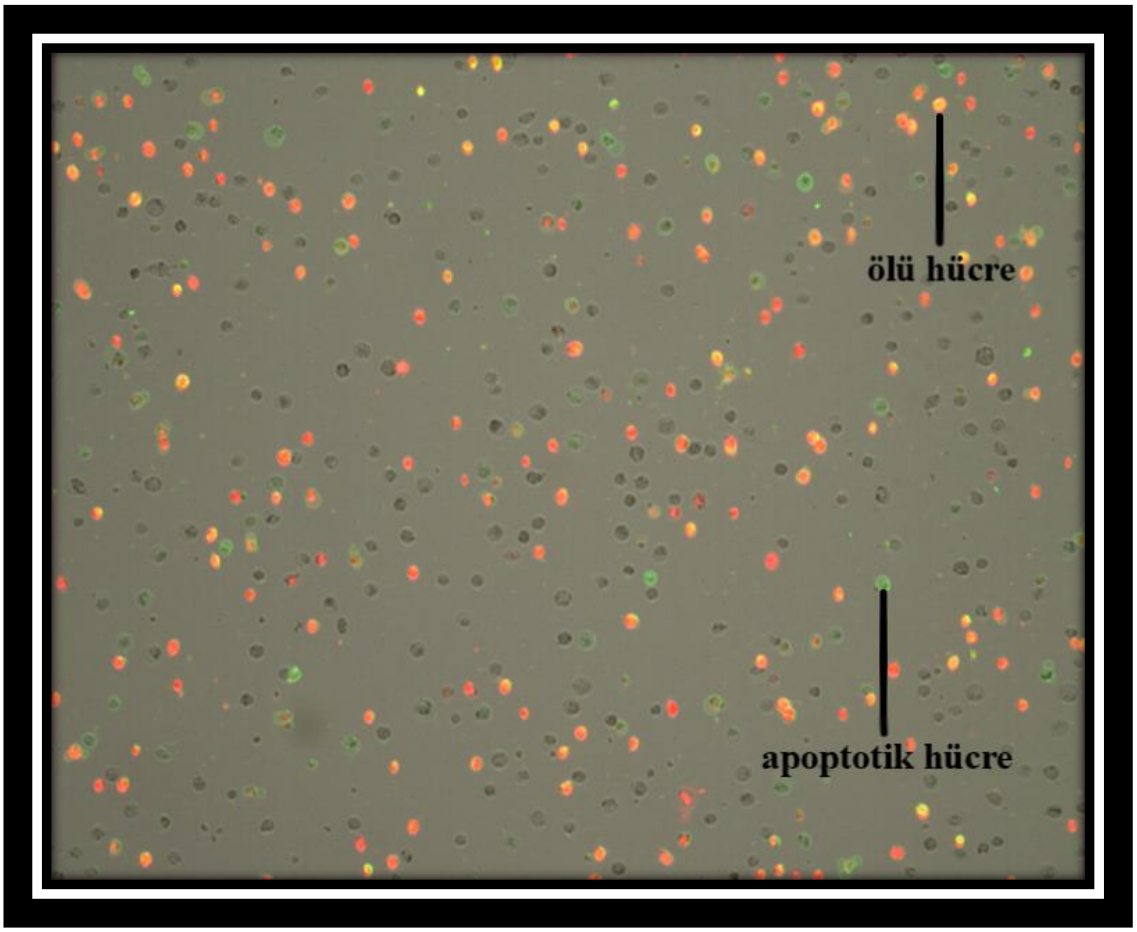
*R. sanguineus* kenelerine ait ekstrakt konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonrasında MEF ve HeLa hücre hatları migrasyonu üzerindeki etkisinin Boyden Chamber Testi ile belirlenmesinde, deney sonuçlarının IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) paket programında değerlendirilmesi sonucunda, uygulanan konsantrasyonlardaki migrasyon oranları kontrol grubundan anlamlı derecede farklı bulunmamış ($p>0,05$); böylelikle, kene ekstraktlarının her iki hücre hattında da hücre

migrasyonuna etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9., Çizelge 4.6.; Şekil 4.10., Çizelge 4.7.).

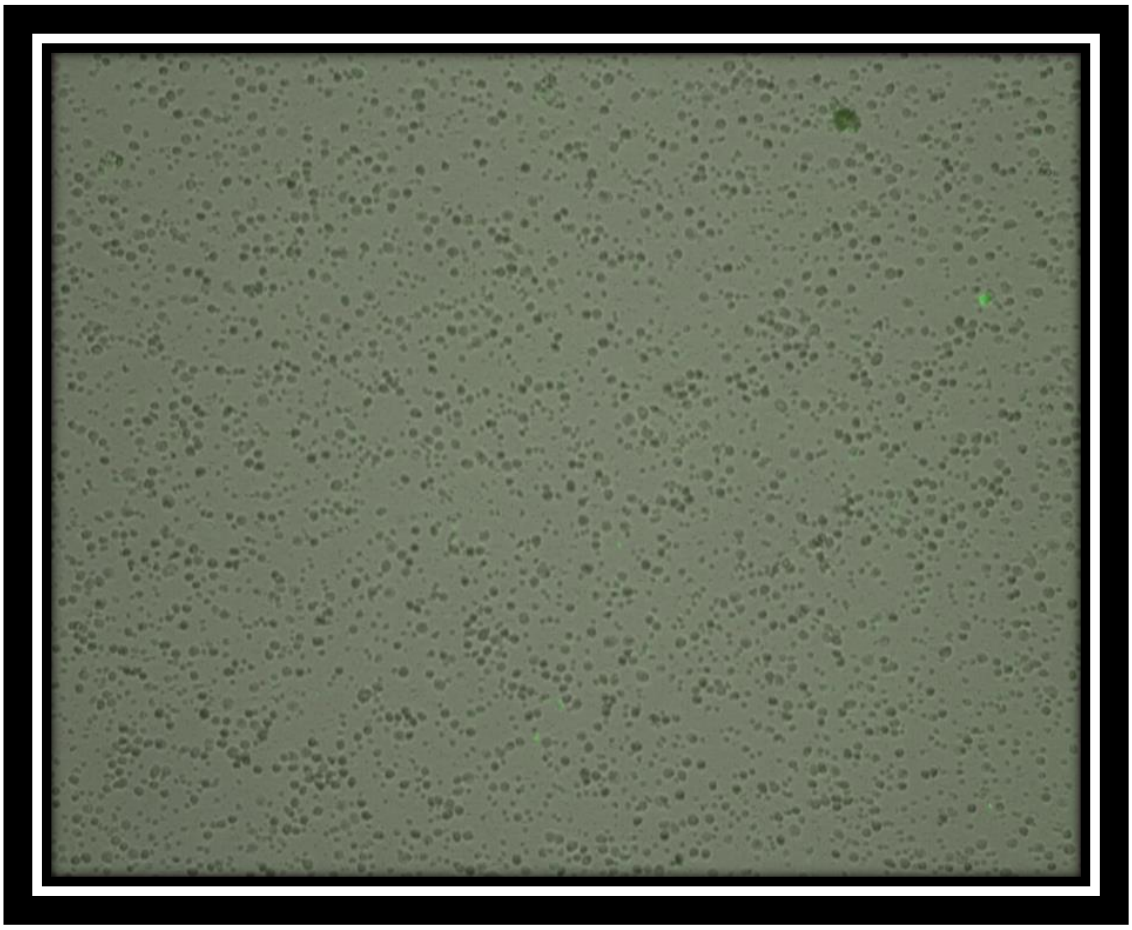
### 4.2.3. Annexin V Testi




**Şekil 4.11.** *R. sanguineus* kenelerine ait IC50 konsantrasyonundaki ekstraktların HeLa hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş HeLa hücrelerinden bir görüntü; apoptotik hücreler yeşil flouresans, ölü hücreler kırmızı ve yeşil flouresans (sarı olarak gözlemlenir) gösterir ve canlı hücreler az veya hiç flouresans göstermez.




**Şekil 4.12.** *R. sanguineus* kenelerine ait IC50/2 konsantrasyonundaki ekstraktların HeLa hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş HeLa hücrelerinden bir görüntü; apoptotik hücreler yeşil flouresans, ölü hücreler kırmızı ve yeşil flouresans (sarı olarak gözlemlenir) gösterir ve canlı hücreler az veya hiç flouresans göstermez.



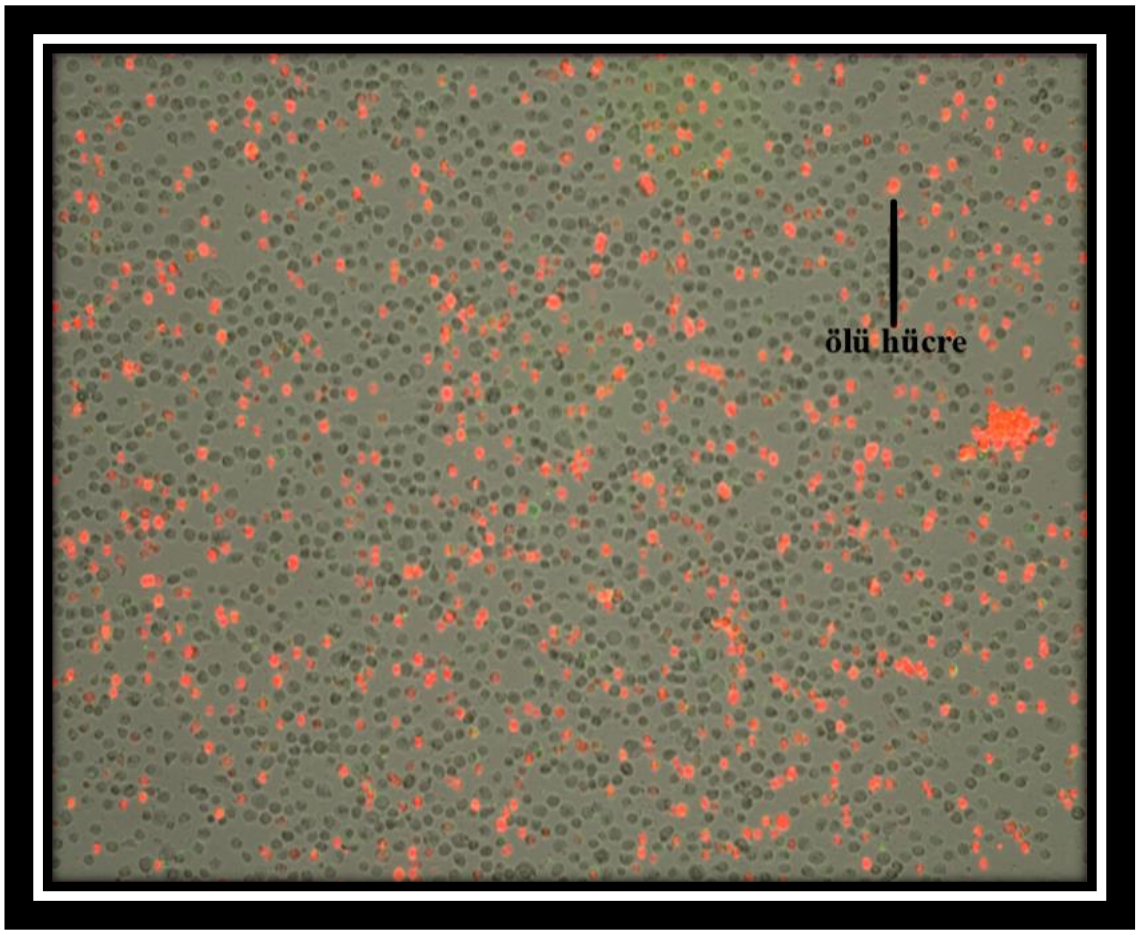
**Şekil 4.13.** *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların HeLa hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş HeLa hücrelerinin kontrol grubundan bir görüntüsü; canlı hücreler az veya hiç flouresans göstermez. (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

**Çizelge 4.8.** *R. sanguineus* kenelerine ait ekstrakt konsantrasyonlarının (IC50 ve IC50/2) HeLa hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testindeki analiz sonuçları (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

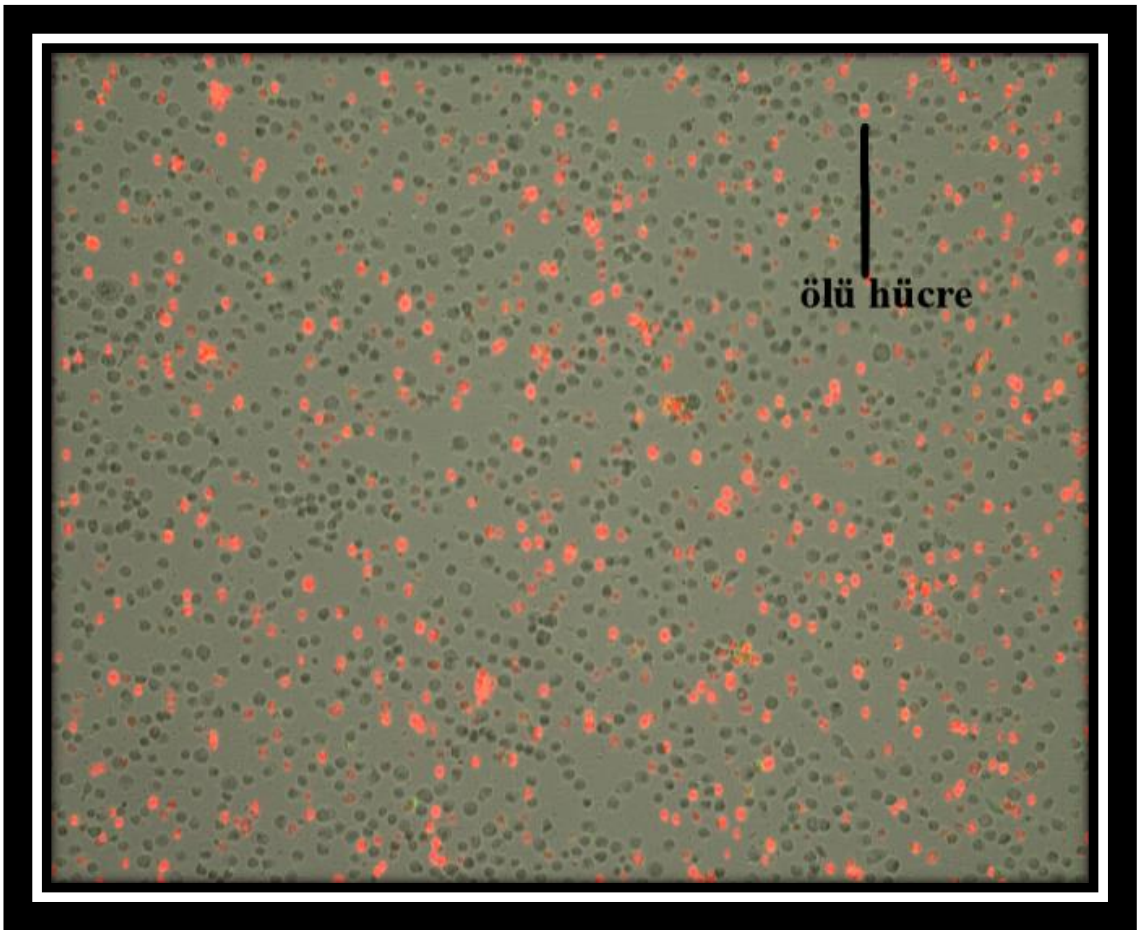
| Uygulanan kene ekstraktı konsantrasyonları | Canlı hücre % | Apoptotik hücre % | Ölü hücre % |
|---|---|---|---|
| Kontrol | %100 | %9 | %0 |
| IC50 konsantrasyonu | %4 | %32 | %44 |
| IC50/2 konsantrasyonu | %28 | %30 | %42 |

Annexin V testinde, HeLa hücreleri için, MTT testi ile tespit edilen *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların 48.saatteki IC50 konsantrasyonuna (%100'lük konsantrasyon) göre uygulama yapılmış; analiz sonucu elde edilen IC50 konsantrasyonu için %32,

IC50/2 konsantrasyonu için %30 apoptotik hücre oranı ile *R. sanguineus* kene ekstraktlarının HeLa hücrelerinde neden olduğu erken dönem apoptozun varlığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.8.).




**Şekil 4.14.** *R. sanguineus* kenelerine ait IC50 konsantrasyonundaki ekstraktların MEF hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş MEF hücrelerinden bir görüntü; apoptotik hücreler yeşil flouresans, ölü hücreler kırmızı ve yeşil flouresans (sarı olarak gözlemlenir) gösterir ve canlı hücreler az veya hiç flouresans göstermez.




**Şekil 4.15.** *R. sanguineus* kenelerine ait IC50/2 konsantrasyonundaki ekstraktların MEF hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V yöntemi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş MEF hücrelerinden bir görüntü; apoptotik hücreler yeşil flouresans, ölü hücreler kırmızı ve yeşil flouresans (sarı olarak gözlemlenir) gösterir ve canlı hücreler az veya hiç flouresans göstermez.



**Şekil 4.16.** *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların MEF hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testi ile belirlenmesinde Tali® Image-Based Cytometer cihazı ile elde edilmiş MEF hücrelerinin kontrol grubundan bir görüntüsü; canlı hücreler az veya hiç flouresans göstermez. (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

**Çizelge 4.9.** *R. sanguineus* kenelerine ait ekstrakt konsantrasyonlarının (IC50 ve IC50/2) MEF hücrelerinde 48. saatteki apoptotik etkilerinin Annexin V testindeki analiz sonuçları (Kontrol grubunda kene ekstraktları ile muamele edilmemiş hücre hatları bulunmaktadır)

| Uygulanan kene ekstraktı konsantrasyonları | Canlı hücre % | Apoptotik hücre % | Ölü hücre % |
|---|---|---|---|
| Kontrol | %100 | %0 | %0 |
| IC50 konsantrasyonu | %50 | %7 | %43 |
| IC50/2 konsantrasyonu | %52 | %6 | %42 |

Annexin V testinde, MEF hücreleri için, MTT testi ile tespit edilen *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların 48.saatteki IC50 konsantrasyonuna (%100'lük konsantrasyon) göre uygulama yapılmış; analiz sonucu elde edilen IC50 konsantrasyonu için %7, IC50/2

konsantrasyonu için %6 apoptotik hücre oranı ile *R. sanguineus* kene ekstraktlarının MEF hücrelerinde neden olduğu erken dönem apoptozun varlığı tespit edilmiş; sonuç olarak HeLa hücrelerinin MEF hücrelerine göre, IC50 konsantrasyonu için %25, IC50/2 konsantrasyonu için %24'lük bir farkla apoptotik hücre yüzdelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8., Çizelge 4.9.).

### 4.3. Ames Testi

**Çizelge 4.10.** *S. typhimurium* TA98 suşunun kullanıldığı Ames testinde *R. sanguineus* kene ekstraktı konsantrasyonlarının mutajenik etki sonuçlarına göre ortalama $his^+$ revertant koloni sayıları ve standart sapma değerleri

| Uygulanan kene ekstraktı konsantrasyonları | Ortalama | Standart sapma |
|---|---|---|
| %0,31 | 20,78 | 1,641 |
| %0,63 | 20,78 | 1,641 |
| %1,25 | 21,00 | 1,581 |
| %2,5 | 21,33 | 1,414 |
| %3,13 | 21,56 | 1,424 |
| %5 | 22,78 | 1,481 |
| %6,25 | 23,33 | 1,658 |
| %10 | 24,11 | 1,616 |
| %12,5 | 25,00 | 1,500 |
| %25 | 26,00 | 1,500 |
| %50 | 26,89 | 1,453 |
| %100 | 27,56 | 1,424 |
| Negatif kontrol (DMSO) * | 21 | 1 |
| Negatif kontrol (PBS) * | 25,56 | 1,424 |
| Spontan kontrol** | 21.17 | 1,424 |

*Negatif kontrolde, geriye dönen ($his^+$) bakteri sayısı üzerinde etkilerinin olup olmadığını tespit etmek için, standart mutajeni çözmede kullanılan DMSO (Dimetil sülfoksit) ve kene ekstraktlarını hazırlamada kullanılan PBS (Phosphate-Buffered Saline) kullanılmıştır.

**20-50 revertant/plak olmak üzere, $his^-$ *S. typhimurium* TA98 suşu belirli sınırlar içerisinde spontan $his^+$ hale gelebilmektedir (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

*R. sanguineus* kenelerine ait ekstrakt konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu kullanılarak mutajenik etkilerinin Ames testi ile belirlenmesinde, deney sonuçlarının student testi ile değerlendirilmesi sonucunda, uygulanan konsantrasyonların etkileri kontrol grubundan anlamlı derecede farklı bulunmamış ($p>0,05$); dolayısıyla, mutajenik bir etki tespit edilmemiştir (Çizelge 4.10.).

# BÖLÜM 5

# TARTIŞMA

Kutuplar dışında dünyada çeşitli coğrafik bölgelere yayılabilen keneler, bulunduğu iklim kuşağının özellikleri nedeniyle ülkemizde de yaygın olarak bulunmaktadır (Dinler ve Yavuz, 2010; Keskin, 2009). Kanla beslenen; çeşitli arbovirus, riketsiyal, bakteriyel, protozoer ve helmintik hastalıkların vektörü olan keneler, insan sağlığı için oluşturdukları tehdinin yanı sıra; hayvanlarda et, süt, yumurta, deri, yapağı gibi hayvansal ürünlerin verim ve kalitesinde azalmalara sebep olduklarından yetiştiricilik alanı üzerinden ekonomik kayıpların gözlemlenmesine neden olmaktadır (Akdemir, 1996; Dinler ve Yavuz, 2010; Kaya, 2011; Özbay, 2010). Tüm bu istenmeyen durumları önlemek için yapılan çalışmaların yanı sıra; iklim değişiklikleri, patojenlerde meydana gelen genetik değişikler ve kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişiminin artması, kenelerle ilgili yapılan incelemeleri günümüzde tekrar değerli kılmıştır (İnci ve Düzlü, 2009).

Ülkemizde çeşitli bölgelerde, enfestasyonlarının incelenmesi, tür teşhislerinin yapılması, coğrafik dağılışlarının ve taşıdıkları patojenlerin belirlenmesi üzerine kenelerle ilgili birtakım çalışmalar bulunmaktadır. Ülkemiz dışında da kenelerin yaydığı zoonoz hastalıkların incelenmesi ve kenelerin çeşitli biyolojik etkilerini belirlemek üzere yapılan moleküler çalışmalar bulunmaktadır (Aysul vd., 2010; Efil, 1999; Gülanber, 1996; Keskin, 2009; Kılıç, 2008; Kuloğlu, 2007; Kuloğlu vd., 2004; Öncel vd., 2010).

Trakya yöresinde yapılan kene enfestasyonu araştırmalarında; 56 adet kara kaplumbağasının (*Testudo graeca*) incelenmesi sonucunda kaplumbağaların %98,21'inde toplam 436 kene tespit edilmiş; elde edilen bu kenelerin hepsinin *Hyalomma* cinsine ait olduğunu ve 167 (%38,3) *Hyalomma spp*. larvası, 188 (%43,11) *Hyalomma spp*. nimfi ve 81 (%18,57) *H. aegyptium* erişkininden meydana geldiği belirtilmiştir (Aysul vd., 2010).

Tekirdağ, Kırklareli, Edirne İlleri ve Lüleburgaz, Silivri, Çerkezköy, Çorlu, Hayrabolu, Lalapaşa, Pınarhisar, Malkara, Çatalca ilçelerinde koyunların kene enfestasyonu bakımından incelenmesi çalışmasında toplanan kenelerin morfolojik özelliklerine bakılarak tür teşhisleri yapılmış; çalışma sonucunda, bu yöredeki koyunlarda *Rhipicephalus sanguineus, R. turanicus* ve *R. bursa* türleri tespit edilmiştir (Efil, 1999).

Tekirdağ, Kırklareli, Edirne, Enez, Şarköy, Çatalca, Çorlu, Kırklareli, Silivri, Babaeski, Lüleburgaz, Malkara, Kemerburgaz, Hadımköy'deki sığırlarda kene enfestasyonu incelemesi çalışmasında toplanan kenelerin tür teşhisleri yapılmış; *B. annulatus, R. sanguineus, R. bursa, H. marginatum, H. anatolicum excavatum* türleri elde edilmiştir (Gülanber, 1996).

Keneler, lizozim, defensin gibi çeşitli antimikrobiyal peptidlerle mikrobik enfeksiyonlara karşı kendini savunabilmektedir. Lizozimler hidrolitik enzimlerdir ve bakteriyel hücre duvarı polimeri olan peptidoglikan tabakasındaki N-asetilamin ve N-asetilglukozamin arasındaki β-(1,4) glikosidik bağları parçalama özelliğine sahiptir. (Tanaka ve Fujisaki, 2013). Tanaka ve Fujisaki (2013), *Haemaphysalis longicornis* türü sert kenelerin tükürük bezlerinden HlLysozyme olarak isimlendirdikleri lizozimi elde etmiştir. Bu protein sekansının 121 amino asitten oluştuğu; proteinin moleküler ağırlığının 13.7 kDa, teorik izoelektrik noktasının 9.85 olduğu ve diğer organizmaların lizozimleriyle %41-79 oranında amino asit sekansı benzerliği gösterdiğini rapor edilmiştir.

Keneler, kanla beslenme sırasında konağın savunma mekanizmalarına etki eden çeşitli proteinler salgılamaktadır. Bu proteinlerden lipokalinler, inflamatuar yanıtın modülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Beaufays vd., 2008). Beaufays vd. (2008) tarafından *I. ricinus* türü sert kenelerin tükürük bezlerinden cDNA Sonlarının Hızlı Amplifikasyonu (RACE) ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) ile 14 yeni lipokalin geni tanımlanmış; bu proteinler LIR olarak isimlendirilmiş (*I. ricinus*'tan "Lipokalin") ve 1'den 14'e (LIR1'den LIR14'e) kadar numaralandırılmıştır. Benzerlik oranlarına göre LIR proteinlerinin 6 farklı filogenetik gruba ayrılabileceklerini; proteinlerin sırasıyla 21.8 kDa ila 37.2 kDa ve 4.45 ila 9.57 arasında değişen pM ve pI değerlerinin hesaplandığını ifade etmişlerdir.

Chrudimská vd. (2011) çalışmalarında, *I. ricinus* kene türünde defensin geninin iki izoformunu (*def1* ve *def2*) tanımlamışlardır. Bu çalışmada, her iki genin ekspresyonu, farklı kene organlarında kanla beslenmeyle veya patojen enjeksiyonu ile indüklenmiş; sentetik peptidler def1 ve def2'nin bazı patojenlere (*B. subtilis, E. coli, Micrococcus luteus, P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans*) karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite (minimal inhibisyon konsantrasyonu ve minimal bakterisid konsantrasyon değerleri belirlenmiştir) tespit edilirken; maya, gram negatif bakteriler, kene kaynaklı ensefalit ve Batı Nil Virüsleri'ne karşı bu etki gözlemlenmemiştir. Antimikrobiyal aktivitelere ilaveten, def1 ve def2'nin insan eritrositlerinde hemoliz etkisi de tespit edilmiştir.

*H. longicornis* türü sert kenelerin tükürük bezlerinden longicornsin adı verilen defensin benzeri yeni bir antimikrobiyal peptid, ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) kullanılarak saflaştırılmış; Edman degradasyonu metodu ile amino asit dizisi, DFGCGQGGGMIFMCQRRCMRLYPGSTGFCRGFRCMCDTHIPLRPPFMVG olarak belirlenmiştir. Blast aramasında diğer kenelerdeki defensin benzeri peptidlerle benzerlik gösterdiği ifade edilen çalışmada; longicornsin peptitinin, bakteri ve funguslardan *H. pylori* NCTC11637*; S. aureus* ATCC2592, *S. aureus* 15A, *S. aureus* 6A*; P. aeruginosa* 7A, *P. aeruginosa* 3A; *E. coli* 23A, *E. coli* 27A, *E. coli* ATCC25922; *C. albicans* ATCC2002 'ye karşı antimikrobiyal etkileri tespit edilmiştir. Bu peptitin yeni antimikrobiyal ilaç tasarımları için potansiyel bir aday olduğuna dikkat çekilmiştir (Lu vd., 2010).

Johns vd. (2001), kısmen doymuş *D. variabilis* dişilerinin hemolenfinden elde edilen bir defensini *B. subtilis* ve *B. burgdorferi*'ye karşı antimikrobik etkinlik açısından incelemişlerdir. Defensinin saflaştırılmasının ardından, MALDI-TOF kütle spektrometresi ile molekül ağırlığı 4.2 kDa olarak tespit edilmiş; Edman degradasyonu metodu ile N-terminal sekansı ilk 30 amino asit için, G-F-G-C-P-L-N-Q-G-A-C-H-N-H-C-R-S-1- (R) - (R)-G-G-Y-C-S-Q-I-I-K şeklinde belirlenmiştir. Her ne kadar defensinin tek başına *B. burgdorferi*'ye karşı etkisi hemen görülmese de, defensin ve lizozimin birlikte *B. burgdorferi*'nin % 65'inden fazlasını 1 saat içinde öldürdüğü belirtilmiştir.

Fogaça vd. (1999)'in çalışmalarında, ters fazlı kromatografi ile *B. microplus* kene bağırsağından antibakteriyel aktiviteye sahip bir peptid saflaştırılmıştır. Saflaştırılan peptidin moleküler kütlesi, matriks destekli lazer desorpsiyon-iyonizasyon kütle spektrometrisi ile 3,205.7 Da olarak ölçülmüş; Edman degradasyonu metodu ile amino asit sırası belirlenmiştir. Çalışmada peptidin, *M. luteus, B. megaterium, P. aeruginosa, B. subtilis, E. coli, C. albicans, A. nidulans, E. cloacae, N. crassa* 'a karşı antifungal ve antibakteriyal aktiviteleri incelenmiş; gram-pozitif bakterilere ve mantarlara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir.

*A. hebraeum* türü sert kenelerde yeni bir antimikrobiyal protein tanımlanmış ve hebraein olarak isimlendirilmiştir. *E. coli* OP50, *S. aureus* Oxford, *C. glabrato* ATCC 2001 ve *C. albicans* SC 5314 'e karşı antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir (Lai vd., 2004).

Kenelere ait taşıyıcı proteinler, konak kanındaki heme'yi bağlayabilme, transfer edebilme ve depolayabilme yeteneğine sahiptir. Dupejova vd. (2011)'nin çalışmalarında, *D. marginatus* kenesine ait taşıyıcı hemelipoglikoprotein proteinin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır.

Mikroplusin, *B. microplus* kenesine ait antimikrobiyal bir peptittir. Silva vd. (2009) çalışmalarında, Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ile mikroplusinin çözelti yapısını tanımlamış; proteinin bakır II ve demir II'yi bağladığını gösterip; metalleri bağlama özelliğinin antimikrobiyal etkinliği ile ilişkili olup olmadığını *Micrococcus luteus*'u model olarak kullanarak test etmişlerdir. Sonuç olarak, mikroplusinin bakteriostatik bir etkiye sahip olduğu ve bakır II ile kültür ortamına eklenmesiyle bakteriostatik etkisinin tamamen tersine döndüğünü; ancak demir II için aynı durumun gözlemlenmediğini ifade etmiş; dolayısıyla mikroplusinin antibakteriyel etkisinin, bakır II'yi bağlama kabiliyetine bağlı olduğuna karar vermişlerdir. Ayrıca, *B. microplus* türü kenelerdeki microplusinin *A. fumigatus* NCPF 2109, *A. niger* A296, *A. flavus*; *P. aeruginosa* ATCC 14502; *C. albicans* MDM 8; *Fusarium sp.*; *S. cerevisiae* ATCC 2601; *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 6538; *S. marcescens* CDC2124; *B. subtilis* PY79, *B. megaterium* ATCC 10778; *E. coli* SBS 363; C. *neoformans* T1444; *E. faecalis* ATCC 19433 türlerine karşı antibakteriyel ve antifungal

etkileri de araştırılmıştır; Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerleri tespit edilmiştir.

Lektin aktivitesine sahip fibrinojen ilişkili proteinlerin, kenelerin doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olduğuna inanılmaktadır. İncelemelerde, fibrinojen ilişkili birkaç protein tanımlanmış; bunlardan biri olan lektin Dorin M, *O. moubata* kenesinin hemolenfinden izole edilip karakterize edilmiştir (Sterba vd., 2011). Sterba vd. (2011), *D. marginatus, R. sanguineus, R. pulchellus* ve *R. appendiculatus* sert kenelerinin hemolimflerinde birkaç fibrinojen ilişkili protein tespit etmişlerdir. Bu çalışma ve fibrinojen ilişkili proteinlere ait daha önceki incelemelerde, fibrinojen ilişkili proteinlerin kene bağışıklık sisteminde işlevi olduğu ve bu nedenle, farmakolojide antimikrobiyal protein olarak ve anti-kene aşılarının yapımında kullanılması konusunda potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir.

Kene tükürük salgısının, kan pıhtılaşması ve hücre ölümünde etkili olan bileşikleri bulunmakta; bazı çalışmalarda da kene tükürüğünde antikanser özellikli proteinlerin bulunduğunu göstermektedir. Simons vd. (2011) *A. cajennense* kene tükürük salgısının, Faktor Xa ve trombin inhibisyonu; trombosit agregasyonu ve ayrıca tümör hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri olmak üzere bazı biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. Ham tükürük salgısı, koagülasyon, fibrinoliz ve trombosit agregasyon sistemlerinde test edilmiş; tükürük salgısının SKT-MEL-28 (melanoma hücreleri) ve MIA PaCa-2 (pankreas adenokarsinoma hücreleri) üzerindeki sitotoksik etkileri, MTT testi, Flow sitometri ve floresan mikroskopisi ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, ham tükürük salgısının, her iki kanser hücre hattında hücre ölümünü indüklediği; fakat kontrol olarak kullanılan insan fibroblastlarında sitotoksik etkilerin gözlemlenmediği belirtilmiştir. Bu çalışmanın, kanser kontrolünde kullanılacak yeni moleküllerin geliştirilmesi için yeni perspektifler kazandırabileceği düşüncesi ortaya konmuştur.

Kazimírová vd. (2006) tarafından, HeLa hücreleri kullanılarak, aç ve kısmen doymuş *R. appendiculatus, A. variegatum, D. reticulatus, I. ricinus* türü sert kenelerin tükürük bezi ekstraktlarının anti-proliferatif ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, bütün kene türlerinde tükürük bezi ekstraktlarının HeLa hücrelerinin çoğalmasını doza bağımlı bir şekilde baskıladığı tespit edilmiş; araştırmada, kene tükürük

bezlerinde tümör hücrelerinin çoğalmasını baskılayan ve/veya apoptozu tetikleyen bileşenlerin bulunduğu belirtilmiştir.

Önceki çalışmalarda, kısmen doymuş *H. longicornis* kenelerinin tükürük bezlerine ait immünosupressan bir gen tanımlanmış; ekspresyon yeri çoğunlukla tükürük bezleri olmak üzere, genin ağırlıklı olarak kanla beslenme sırasında eksprese edildiği gösterilmiştir. Konnai vd. (2008), bu yeni proteinin sığır mononükleer ve sıçan splenik hücreleri üzerinde proliferatif etkilerini incelemiş; çalışmada proteinin hücrelerin çoğalmasını doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Bilindiği üzere keneler, immün modülatör ve anti-inflamatuar moleküller salgılayarak konağın bağışıklık ve inflamatuar yanıtlarını baskı altına alan zorunlu hematofagus ektoparazitlerdir. *D. variabilis* kenelerinin tükürük bezi ekstraktı ve tükürük salgısının, trombosit kökenli büyüme faktörünce (PDGF) uyarılmış IC-21 makrofaj ve NIH3T3-L1 fibroblast migrasyonu üzerinde etkisi olduğu belirlenmiştir (Poole vd., 2013).

Kramer vd. (2011), *D. variabilis* türü kenelerin tükürük salgısının, fare makrofaj hücre hattı IC-21 migrasyonuna etkisini araştırmış; incelemede, tükürük salgısının trombosit kökenli büyüme faktörünce (PDGF) uyarılmış hücre migrasyonunu arttırdığı görülmüştür.

Hücre migrasyonu, tümör invazyonu ve metastazı için bir ön şarttır. Başka bir çalışmada kene tükürük salgısının yara iyileşmesi tepkisine dahil olan hücrelerin migrasyon aktivitelerinin modüle ettiğini gösteren Poole vd. (2013), kene tükürük salgısının Saos-2 osteosarkom ve MDA-MB-231 (MB-231) meme kanseri hücrelerinin migrasyon ve invaziv aktiviteleri üzerindeki etkisini araştırmış; incelemede, tükürük salgısının Saos-2 ve MB-231 hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir.

Sousa vd. (2018), Brezilya'da *R. sanguineus, A. sculptum* ve *A. parvum* kenelerinin tükürük salgılarının MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki etkilerini değerlendirmiş; incelemeler sonucunda, üç kene türüne ait tükürük salgısının da MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında MTT testi ile sitotoksik etkisi tespit edilirken, tümörijenik olmayan MCF-10A meme hücre hatlarında bu etki görülmemiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 tümör hücrelerinin yüzeyinde görülen

morfolojik değişiklikler MCF-10A hücrelerinde meydana gelmemiştir. Çalışmada ayrıca, tümör hücre ölümlerinin kaspaz-3 ve kaspaz 7 aktivitesi tarafından indüklenen apoptoz ile gerçekleştiği de gösterilmiş; bu değişiklikler MCF10A hücrelerinde gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlarla, sözkonusu kene türlerine ait tükürük salgısının yeni meme kanseri ilaçlarının geliştirilmesi için kullanılabileceği belirtilmiştir.

Kalretikulin (calreticulin) proteinleri, hem omurgasız hem de omurgalılar olmak üzere çok çeşitli ökaryotik organizmalarda bulunabilen kalsiyum bağlayıcı proteinlerdir. Anti-hemostatik, anti-enflamatuar ve immünomodülatör özelliği olan bu moleküller; hücre çoğalması, kalsiyum depolaması, protein katlanması, gen ekspresyonunun modülasyonu, hücre apoptozu ve hücre farklılaşması gibi birçok hücresel fonksiyonda rol oynayabilmektedir. Kalretikulinler, konaktan kanla beslenme, patojen iletimi ve konak allerjik yanıtları ile ilgili olarak kene tükürük salgısının da önemli bileşenleridir. Kalretikulinler gibi tükürük salgısı proteinlerini kodlayan genlerin özelliklerinin belirlenmesi; kanla beslenme sırasında kene-konak etkileşim mekanizmalarını anlamak ve kene kontrol stratejileri geliştirmek için önem taşımaktadır. Sert kenelerde, *crt* genlerinin türler arasında korunmuş yalnızca bir introna sahip olduğu gösterilmiştir (Porretta vd., 2016). Porretta vd. (2016), *crt* ekson-intron yapısını ve bir moleküler marker olarak *crt* geninin potansiyel faydasını değerlendirmek için çalışmalarında, *Rhipicephalus* kenelerinde (*R. sanguineus (sensu lato), R. guilhoni, Rhipicephalus* sp. I, *Rhipicephalus* sp. III, *Rhipicephalus* sp. IV, *R. muhsamae* ve *R. turanicus*) *crt* geninin ekson-intron yapısını ve varyasyonunu araştırmışlardır. Kenelerdeki *ctr* geninin ekson-intron bölgesinin sekansı analizi yapılmış; elde edilen diziler arasındaki genetik farklılık ve filogenetik ilişkiler değerlendirilmiştir. Ayrıca, *R. sanguineus* keneleri ile igili olarak, bu kenelerden elde edilen tükürük salgısının, önemli immün modülatör özelliklere sahip iki molekül olan adenozin (ADO) ve prostaglandin $E_2$'yi ($PGE_2$) içerdiği ortaya konulmuştur (Anatriello vd., 2017). Oliveira vd. (2013) de, dişi *R. sanguineus* kenelerinin tükürük salgısındaki proteinlerden; çimento benzeri proteinleri, bir thyropin proteaz inhibitörü ve 2 lipokalini elde etmiştir. Bu çalışmaların yanı sıra son zamanlarda, farklı kene türlerinden izole edilen tükürük salgısının kemokin nötralize edici aktivitesi gösterilmiş; Frauenschuh vd. (2007), *R. sanguineus* kenelerine ait kemokin bağlayıcı proteinin moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

İnterlökin-8 (IL-8), memeli inflamatuvar ve bağışıklık hücrelerini yaralanma ve enfeksiyon bölgesine yönlendiren birçok memeli kemokinden (kemotaktik sitokinler) biridir. Hajnická vd. (2001), IL-8 ELISA kullanarak, çeşitli ixodid kene türlerine ait (*D. reticulatus, R. appendiculatus, I. ricinus, H. inermis, A. variegatum*) tükürük bezi ekstraktlarının IL-8 düzeyini azalttığını tespit etmişlerdir.

Hatırlanacağı üzere, kanla beslenen eklembacaklıların tükürük salgıları, kanla beslemeyi kolaylaştırmak için omurgalı konaklarının hemostatik, inflamatuar ve bağışıklık yanıtlarını modüle etmektedir. Önceki bir çalışmada, ixodid kene türlerine ait tükürük bezi ürünlerinin, en az dört farklı memeli büyüme faktörünü (Transforme edici büyüme faktörü β1, hepatosit büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü 2 ve trombosit türevli büyüme faktörü) hedefleyerek yara iyileştirici yanıtı etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) bağlayıcı aktivite gösteren *H. excavatum* türü kenelerin *in vitro* hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve aktin sitoskeletonunun bozulmasıyla hücre morfolojisinde değişiklikler oluşturduğu tespit edilmiştir (Slovak vd., 2014). Slovak vd. (2014)'nin araştırmalarında da, kene hipostomu uzunluğu ve anti-PDGF aktivitesi arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Hipostom uzunluğu ile dolayısıyla deri hasarının derinliği ve PDGF bağlama aktivitesi arasındaki bu açık ilişkinin, diğer büyüme faktörleri veya yara iyileşmesinde önemli olan diğer sitokinler için belirgin olmadığı (keratinosit büyüme faktörü, interlökin-6 ve stromal hücreden türeyen faktör 1) belirtilmiştir.

Bazı kenelerin tükürük salgısı ve tükürük bezi ekstraktları humoral bağışıklığı etkileyebilmekte ve kenenin taşıdığı patojenlere karşı B hücreleri ve T hücreleri ile cevap verilebilmektedir. Nitekim, yapılan bazı çalışmalar, kene tükürüğünde B-hücresi inhibe edici faktörün oluştuğunu göstermektedir (Yu vd., 2006). Yu vd. (2006)'nin çalışmalarında, *H. asiaticum asiaticum* sert kenesinin tükrük bezlerinden B-hücresi inhibe edici aktiviteye sahip yeni bir protein saflaştırılmış; karakterize edilmiş ve B-hücresi inhibe edici faktör (BIF) olarak adlandırılmıştır.

Proteazlar, kenelerin protein sindiriminde önemli bir rol oynamaktadır. Kan proteinlerinin orta bağırsak (midgut) hücreleri tarafından algılanması, orta bağırsak hücrelerinde proteazların varlığına işaret etmekte; bu hücreler kan bileşenlerini endositoz etmektedir (Goudarzi vd., 2008). Goudarzi vd. (2008), doymuş dişi *H. anatolicum*

*anatolicum* kenelerinin orta bağırsak hücrelerinde bulunabilen proteazları incelemişlerdir. Kenelerin orta bağırsak dokusundan ekstraktlar hazırlanmış; sonrasında bu ekstraktlardan tripsin benzeri enzim; kimotripsin benzeri enzim; karboksipeptidaz B; katepsin B, katepsin C ve katepsin D elde edilmiş; tripsin benzeri enzimin hücre membran proteini; karboksipeptidaz B, katepsin B, katepsin C ve katepsin D'nin sitoplazmik proteinler olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda, Edirne İli'ndeki belirlenen çalışma merkezlerinde bulunan kene enfestasyonu yönünden muayene edilen hayvanlardan (büyükbaş hayvanlar, köpekler) örneklenen kenelerin *R. sanguineus* türü ve *Hyalomma* cinsi keneler olduğu tespit edilmiş; *R. sanguineus* kenelerine ait ekstraktların antimikrobiyal, mutajenik, apoptotik, antiproliferatif ve hücre migrasyonuna etkileri ilk kez araştırılmıştır.

İncelemeler sonucunda, *R. sanguineus* kene ekstraktlarının mutajenik ve antimikrobiyal etkilerinin olmadığı gözlemlenmiştir. Kene ekstraktlarının disk difüzyon testi kullanılarak antimikrobiyal etkilerinin olmadığının gözlemlenmesi, bu ekstraktların antimikrobiyal ilaç üretiminde kullanılabileceği fikrini desteklememektedir. Ayrıca, Ames testi ile bu ekstraktların mutajenik aktivitesi de görülmemiş; dolayısıyla mutasyon oluşumuyla karakterize olan genetik bir hasara neden olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında ise, ekstraktların HeLa ve MEF hücrelerinin migrasyonuna etkileri görülmezken, bu iki hücre hattında apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. MTT testi ile HeLa ve MEF hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı tespit edilen kene ekstraktlarının, Annexin V testi ile de apoptotik hücre ölümününe neden olmasının belirlenmesiyle; bu iki uygulama verilerinin birbiriyle tutarlı olduğu ve test sonuçlarının birbirini desteklediği görülmüştür. Bununla beraber, kene ekstraktlarının bu iki hücre hattında proliferasyon inhibisyonu ve apoptoza yol açtığı göz önünde bulundurulursa; hücre hatlarının Boyden chamber testi ile migrasyonlarının incelenmesi sonucunda, ekstraktların hücre migrasyonlarına bir etkilerinin görülmemesi, bu kene ekstraktlarının, HeLa kanser hücre hattında tümör invazyonu ve metastazına neden olmadığı; MEF hücre hattı için ise yara iyileşme sürecinde etkisinin olmadığına işaret etmektedir.

Kenelerin insan ve hayvan sağlığı için oluşturduğu tehdit, neden olduğu tıbbi ve ekonomik kayıplar gibi olumsuz durumlar göz önüne alınırsa; kene ekstraktlarının

antimikrobiyal, mutajenik ve hücre migrasyonuna etkilerinin olmaması; sağlıklı MEF hücreleri üzerinde ise apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin olmasının tespiti kenelerle ve kene ile ilişkili hastalıklarla ilgili yeni incelemeler başlatmak ve bu alanda daha ileri araştırmalar yapmak için temel oluşturmaktadır. Kene ekstraktlarının apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin HeLa kanser hücrelerinde görülmesi ise, bu ekstraktların antikanser ajan olarak kanser tedavisinde kullanılabileceği fikrini akla getirse de, bu etkilerin sağlıklı MEF hücrelerinde de görülmesi; ekstrakların, ilaca dirençli kanser hücrelerinde denenebileceği ve dirençli olgularda tedaviyi sağlayabileceği düşüncesini daha çok desteklemektedir. Dolayısıyla, özellikle günümüzde hem tedavi etmesi hem de olumsuz etkilere neden olmaması beklentisiyle geliştirilmek istenen yeni antikanser ilaçlarının üretilmesi araştırmalarına katkı sağlaması açısından çalışmamız, kaynak ve önem teşkil etmektedir.

# KAYNAKLAR


Akdemir, C. (1996). *Van ve Yöresi Koyunlarında Rhipicephalus Soyuna Bağlı Kene Türlerinin Ekolojisi, Mevsimsel Aktivitesi ve İnsidansı.* (Yüksek lisans tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.

Akdemir, C. (2001). *Van Yöresi Koyunlarında Bulunan Kene Türlerinin Tespiti Epidemiyolojisi Üzerine Araştırmalar.* (Doktora tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.

*All About Dogs by LowchensAustralia.* (2009). 04.03.2019 tarihinde http://www.lowchensaustralia.com/pests/paralysis-tick/basic-anatomy.htm adresinden erişildi.

Amand, M. M., Hanover, J. A., Shiloach, J. (2016). A comparison of strategies for immortalizing mouse embryonic fibroblasts. *Journal of Biological Methods*, *3*(2), 1-9. doi:10.14440/jbm.2016.110

Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 70,* 782-786.

Anatriello, E., Oliveira, C. J. F., Oliveira, N. B., Fisch, A., Milanezi, C. M., da Silva, J. S., de Miranda-Santos, I. K. F., Ferreira, B. R. (2017). Interaction between saliva's adenosine and tick parasitism: effects on feeding and reproduction. *Parasites & Vectors, 10*(326), 1-12. doi: 10.1186/s13071-017-2248-8.

Aslan, M. M., Güzel, G. (2009). *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin salkım güvesi (*Lobesia botrana* (Den. & Schiff.)) (Lepidoptera: Tortricidae) ve yararlılara karşı etkilerinin araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi, 12*(2), 44-51.

*ATCC.* (2016). 04.03.2019 tarihinde http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-2.aspx?geo_country=tr#characteristics adresinden erişildi.

Atmaca, S., Özekinci, T., Yakut, S., Akpolat, N., Gül, K. (2018). *Serratia* türlerinin identifikasyonu, klinik dağılımı, antibiyotik duyarlılığı. *Ankem, 32*(2), 62-71. doi: 10.5222/ankem.2018.062

Avcı, E. (2015). *Juglonun BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Değerlendirilmesi, İnvazyon ve Anjiyogenez Üzerine Etkisinin Araştırılması.* (Yüksek lisans tezi). Selçuk Üniveristesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Aydoğan, G. (2008). *Tokat ve Kelküt Havzası Civarındaki İllerde Kene-Kökenli Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün RT-PCR Yöntemi ile Teşhisi.* (Yüksek lisans tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

Aysul, N., Kar, S., Yılmazer, N., Alp, H. G., Gargılı, A. (2010). Trakya Yöresi'ndeki kaplumbağalarda (*Testudo graeca*) *Hyalomma aegyptium* (Lineaus, 1758)'un yaygınlığı. *Pendik Veteriner Mikrobiyolojisi Dergisi, 37*(1), 53-56.

Ayyıldız, N., Doğan, S. (2010). *Akaroloji ders notları.*

Bakırcı, S. (2009). *Batı Anadolu Bölgesi Sığırlarında Bulunan Kene Türleri ve Yaygınlığı.* (Doktora tezi). Uludağ Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Barış, A. (2007). *Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel MutajenitelerininAmes/Salmonella/Mikrozom Test Yönyemiyle Araştırılması.* (Yüksek lisans tezi). Afyon Kocatepe Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.

Başyemenici, H. (2012). *Silene salsuginea Hub.-Mor. Ekstrelerinin Antibakteriyel Aktivitesi.* (Yüksek lisans tezi). Selçuk Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., Decrem, Y., Prevot, P., Santini, S., Brasseur, R., Brossard, M., Vanhaeverbeek, M., Bureau, F., Heinen, E., Lins, L., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2008). *Ixodes ricinus* tick lipocalins: identification, cloning, phylogenetic analysis and biochemical characterization. *PloS One, 3*(12), 1-11.

Chrudimská, T., Slaninová, J., Rudenko, N., Růžek, D., Grubhoffer, L. (2011). Functional characterization of two defensin isoforms of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors, 4*(63), 1-9.

Coimbra-Dores, M. J., Nunes, T., Dias, D., Rosa, F. (2016). *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) species complex: morphometric and ultrastructural analyses. *Experimental and Applied Acarology,70*(4), 455-468. doi: 10.1007/s10493-016-0095-5

Conner, D. A. (2001). Mouse embryonic stem (ES) cell isolation. *Current Protocols in Molecular Biology*, *52*(1), 23.4.1-23.4.9. doi: 10.1002/0471142727.mb2304s52

Çalık, İ. (2013). *Alyssum Virgatum Nyar. Sulu Ekstrelerinin Antisitotoksik ve Antimutajenik Özelliklerinin Allium ve Ames Testi iler Araştırılması.* (Yüksek Lisan tezi). Afyon Kocatepe Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.

Çelik, H. (2013). *İnsan Lenfosit Hücre Kültürü Ortamında Alüminyum Oluşturduğu Sitotoksisite ve Genotoksisiteye Karşı Sarımsak (Allium sativum) ve Çörek Otu Tohumu (Nigella sativa) Ekstraktlarının Araştırılması.* (Doktora tezi). Gaziantep Üniveristesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.

Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., Otranto, D. (2013). Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasites & Vectors*, *6*(213), 1-17.

de Abreu, M. R., Rocha, F. A., Furquim, K. C. S., Anholeto, L. A., Novaes, F. C. F., Morsoleto, M. J., Camargo-Mathias, M. I. (2014). Salivary glands of female ticks *Rhipicephalus sanguineus* like a potential source of molecules with inhibitory action: *in vivo* study with Walker 256 tumor cells. *Journal of Pharmaceutical Care and Health Systems*, *1*(4), 1-8.

Dikmen, M. (2017). Aprepitantın insan glioblastoma U87MG hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkileri. *Marmara Pharmaceutical Journal*, *21*, 156-164. doi: 10.12991/marupj.259893

Dinler, O., Yavuz, O. (2010). Repellent compounds used for protection from ticks and their toxicological evaluation. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *67*(4), 199-212.

du Rand, N. (2009). *Isolation of Entomopathogenic Gram Positive Spore Forming Bacteria Effective Against Coleoptera*. (Doktora tezi). University of KwaZulu-Natal/Faculty of Science and Agriculture, Pietermaritzburg, South Africa.

Dupejova, J., Sterba, J., Vancova, M., Grubhoffer, L. (2011). Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick, *Dermacentor marginatus*: structural and functional characterization. *Parasites & Vectors*, *4*(4), 1-10.

Ediz, N., Beyatlı, Y. (2005). *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından biyoplastik üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, *3*(5), 1-22.

Efil, İ. İ. (1999). *Trakya Koyunlarında Ixodid Kene Enfestasyonları.* (Doktora tezi). İstanbul Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Ekici, M. (2011). *Tokat ve Amasya İllerinde İnsan ve Kirpilerden Toplanan Sert Kenelerde Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) Varlığının Belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

*Featured Creatures Entomology and Nematology*. (2018). 04.03.2019 tarihinde http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/medical/brown_dog_tick.htm adresinden erişildi.

Fikrig, E., Pal, U., Chen, M., Anderson, J. F., Flavell, R. A. (2004). OspB antibody prevents *Borrelia burgdorferi* colonization of *Ixodes scapularis*. *Infection and Immünity*, *72*(3), 1755-1759. doi: 10.1128/IAI.72.3.1755-1759.2004

Fogaça, A. C., da Silva, P. I., Miranda, M., Bianchi, A. G., Miranda, A., Ribolla, P. E. M., Daffre, S. (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(36), 25330-25334. doi: doi: 10.1074/jbc.274.36.25330

Frauenschuh, A., Power, C.A., Déruaz, M., Ferreira, B. R., Silva, J. S., Teixeira, M. M., Dias, J. M., Martin, T., Wells, T. N., Proudfoot, A. E. (2007). Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(37), 27250-27258. doi: 10.1074/jbc.M704706200

Gäumann, R., Mühlemann, K., Strasser, M., Beuret, C. M. (2010). High-throughput procedure for tick surveys of Tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(13), 4241-4249. doi:10.1128/AEM.00391-10

Goudarzi, G. H., B., Abdigoudarzi, M., Piriaii, M., Bagherian, R., Goudarzi, H., Karimi, G. H. (2008). Proteases detection of in vitro culture of midgut cells from *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Acari: Ixodidae). *Archives of Razi Institute*, *64(*1), 23-28.

Grimont, P. A. D., Jackson, T. A., Ageron, E., Noonan, M. J. (1988). *Serratia entomophila* sp. nov. Associated with Amber Disease in the New Zealand Grass Grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *38*(1), 1-6. doi:10.1099/00207713-38-1-1. ISSN 0020-7713

Gülanber, A. (1996). *Trakya'da Sığırlarda Ixodid Kene Enfestasyonları*. (Doktora tezi). İstanbul Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, *2*, 73-78.

Güneş, T. (2002). *Yöremizde Risk Gruplarında Lyme Seropozitifliğinin Kenelerde Borrelia Burgdorferi Taşıyıcılığının Araştırılması*. (Doktora tezi). Cumhuriyet Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.

Gürbüz Sarıgöl, C. (2007). *Farklı Kök Kanal Yıkama Solüsyonları ve Kanal Dolgu Patlarının Biyouyumluluklarının Hücre Kültüründe Araştırılması*. (Doktora tezi). Ege Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Hajdusek, O., Síma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., Kopacek, P. (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *3*(26), 1-15. doi: *10.3389/fcimb.2013.00026*

Hajnická, V., Kocakova, P., Slovikova, M., Slovak, M., Gasperik, J., Fuchsberger, N., Nuttall, P. (2001). Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunology*, *23*(9), 483-489.

Hekimoğlu, O. (2010). *Ankara İli'nde Bulunan Kene Türleri ve Vektör Olarak Özellikleri.* (Yüksek lisans tezi). Hacettepe Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

İnci, A., Düzlü, Ö. (2009). Vektörler ve vektörlerle bulaşan hastalıklar. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *6*(1), 53-63.

Johns, R., Sonenshine, D. E., Hynes, W. L. (2001). Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *31*, 857-865.

Jozefczuk, J., Drews, K., Adjaye, J. (2012). Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Journal of Visualized Experiments, 64*, 1-5. doi: 10.3791/3854 (2012).

Kalaylı, E., Beyatlı, Y. (2003). *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DNA 'ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1*(12), 24-35.

Kalkan, S., Halkman, K. (2006). *Bacillus cereus* ve içme sütünde oluşturduğu sorunlar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, *4*(1), 1-11.

Kara, A. (2012). *Resveratrolün Meme Kanseri Hücre Kültüründeki p53 Aracılı Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksisitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), İmmunsitokimya ve MTT Yöntemleriyle Araştırılması.* (Doktora tezi). Atatürk Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kaya, M. (2011). *Tatvan Yöresinde Yaşayan ve Kene Isırığı Hikayesi Olan İnsanlarda Babesiosis Yaygınlığının Araştırılması.* (Yüksek Lisans Tezi). Erciyes Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.

Kayacan, S. (2015). *Endemik Centaurea nerimaniae Ekstresinin Kanser Hücre Soylarında Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri.* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Kaynar, P., Beyatlı, Y. (2006). Balıklardan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, *4*(3), 1-30.

Kazimírová, M., Dovinová, I., Rolníková, T., Tóthová, L., Hunáková, L. (2006). Anti-proliferative activity and apoptotic effect of tick salivary gland extracts on human HeLa cells. *Neuroendocrinol Letters, 27*(2), 48-52.

Keskin, A. (2009). *Amasya İli'nde Bulunan Sert Kenelerin (Acari: Ixodidae) Faunastik Açıdan İncelenmesi.* (Yüksek lisans tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

Kılıç, H. (2008). *Trakya Bölgesi Kırsal Alanlarında Kene Isırığı Öyküsü olan Kişilerde Erlihyoz Seropozitifliği*. (Uzmanlık Tezi). Trakya Üniversitesi/Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Edirne.

Kılınçer, N., Yiğit, A., Kazak, C., Er, M. K., Kurtuluş, A., Uygun, N. (2010). Teoriden pratiğe zararlılarla biyolojik mücadele. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, *1*(1), 15-60.

Konnai, S., Nakajima, C., Imamura, S., Yamada, S., Nishikado, H., Kodama, M., Onuma, M., Ohashi, K. (2008). Suppression of cell proliferation and cytokine expression by HL-p36, a tick salivary gland-derived protein of *Haemaphysalis longicornis*. *Immunology, 126*(2), 209-219. doi: doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02890.x

Kramer, C. D., Poole, N. M., Coons, L. B., Cole, J. A. (2011). Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21. *Experimental Parasitology, 127*(3), 665-671. doi: 10.1016/j.exppara.2010.11.012

Kubes, M., Fuchsberger, N., Labunda, M., Zuffova, E., Nuttall, P. A. (1994). Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity *in vitro*. *Immunology, 82*(1), 113-116.

Kuloğlu, F. (2007). Benekli ateş grubu riketsiyozları. *Klinik Gelişim Dergisi*, *20*(4), 112-121.

Kuloğlu, F., Akata, F., Tansel, Ö., Gürcan, Ş., Şakru, N., Otkun, M., Tuğrul, M. (2004). Trakya Bölgesi'nde serolojik olarak doğrulanmış Akdeniz benekli ateşi olguları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, *28*(3), 167-170.

Lai, R., Takeuchi, H., Lomas, L. O., Jonczy, J., Rigden, D. J., Rees, H. H., Turner, P. C. (2004). A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *The Faseb Journal*, *18*(12), 1447-1449. doi: 10.1096/fj.03-1154fje

Lo, N., Beninati, T., Sassera, D., Bouman, E. A. P., Santagati, S., Gern, L., Sambri, V., Masuzawa, T., Gray, J., Jaenson, T. G. T., Bouattour, A., Bitam, I., Kenny, M. J., Şen (Güner), E., Kharitonenkov, I. G., Bandi, J. (2006). Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Microbiology*, *8*(7), 1280-1287. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01024.x

Lu, X., Che, Q., Lv, Y., Wang, M., Lu, Z., Feng, F., Liu, J., Yu, H. (2010). A novel defensin-like peptide fromsalivary glands of the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Protein Science*, *19*(3), 392-397. doi: 10.1002/pro.317

Maron, D. M., Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research, 113*(3-4), 173-215.

Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research, 455*(1-2), 29-60.

Mulenga, A., Sugimoto, C., Ohashi, K., Onuma, M. (2000). Characterization of an 84 kDa protein inducing an immediate hypersensitivity reaction in rabbits sensitized to *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1501*(2–3), 219-226.

*Mybiosource.* (2018). 04.03.2019 tarihinde https://www.mybiosource.com/Cell-Based-Assays-Cell-Migration-Invasion-and-Wound-Healing-Boyden-Chamber-Assays-Haptotaxis-Assays- adresinden erişildi.

Nabizade, U. (2014). *Hormona Dirençli Prostat Kanseri Hücre Kültüründe (DU-145/PC-3) Radyoterapiyle Birlikte Uygulanan Zoledronik Asit ve İbandronatın Etkinliğinin Karşılaştırılması*. (Uzmanlık Tezi). Ege Üniveristesi/ Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, İzmir.

Oliveira, C. J., Anatriello, E., de Miranda-Santos, I. K., Francischetti, I. M., Sá-Nunes, A., Ferreira, B. R., Ribeiro, J. M. (2013). Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by the secretagogues pilocarpine and dopamine. *Ticks and Tick-borne Diseases, 4*(6), 469-477. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.05.001.

Orhan, M. (2009). *Tokat İli Sert Kene Faunasının Belirlenerek Farklı Kene Cinslerinde Aktin Genlerinin Moleküler Karşılaştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi /Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

Orkun, Ö. (2018). Türkiye'de yayılış gösteren bazı ixodid kene türlerinin *16S rDNA* filogenisi temelli moleküler karakterizasyonu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, *42*, 122-129. doi: 10.5152/tpd.2018.5882

Öncel, T., Vural, G., Karaer, Z., Çakmak, A., Yurtalan, S., Öz, İ., Erhan, Z. N., Beyazıt, A., Pişkin, Ç., Deniz, A., Ütük, A. E., Handemir, E., Altınöz, F., Kamburgil, K., Aytekin, H., Kurt, M., Aydın, İ., Kaya, S., Bastem, Z., Kalkan, Y., Temur, A., İçyeroğlu, H., İçyeroğlu, A., Çaya, H., Balkaya, İ., Aksın, N., Açıcı, M. (2010). Türkiye'de sığırlarda *Babesia bovis* ve *B. bigemina*'nın seroprevalansı. *Pendik Veteriner Mikrobiyolojisi Dergisi, 37*(1), 33-42.

Över, L. (2009). *Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne Kene Isırması İle Başvuran Hastaların ve Pilot Bölgelerdeki Kenelerin Araştırılması*. (Doktora tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Özbakır, G. (2011). *Staphylococcus epidermidis, Proteus mirabilis ve Candida albicans Suşlarının Tanımlanması, Antimikrobiyal Ajanlara Karşı Dirençliliklerinin ve Oluşturdukları Biyofilmlerin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Özbay, H. (2010). *Kastamonu Yöresinde Koyun ve Keçilerde Kene Enfestasyonları*. (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.

Özeren, G. S. (2009). *Kene Kaynaklı Lyme Borreliosis'in Hatay Yöresinde Seroprevalansının Tespiti.* (Yüksek lisans tezi). Mustafa Kemal Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay.

Özkan, F. (2013). *Kütahya Yöresi'nde Yayılış Gösteren Kene Türlerinin Araştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Dumlupınar Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.

Öztürk, H. (2009). *Jurinea consanguinea'nın Antioksidan ve Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Öztürk, M. (2012). *Chelidonium majus L' nin Antibakteriyal Aktivitesinin Belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

Poole, N. M., Mamidanna, G., Smith, R. A., Coons, L. B., Cole, J. A. (2013). Prostaglandin $E_2$ in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile. *Parasites & Vectors, 6*(261), 1-11.

Poole, N. M., Nyindodo-Ogari, L., Kramer, C., Coons, L. B., Cole, J. A. (2013). Effects of tick saliva on the migratory and invasive activity of Saos-2 osteosarcoma and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Ticks and Tick-borne Diseases, 4*(1-2), 120-127. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.09.003

Porretta, D., Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Mastrantonio, V., Latta, R., Otranto, D., Urbanelli, S. (2016). Exon-intron structure and sequence variation of the calreticulin gene among *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Parasites & Vectors, 9*(640), 1-10. doi: 10.1186/s13071-016-1909-3

Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li, M. S., Jin, B. R., Je, Y. H. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of microbiology and biotechnology, 17*(4), 547-559.

Saenglee, S., Jogloy, S., Patanothai, A., Leid, M., Senawong, T. (2016). Cytotoxic effects of peanut phenolics possessing histone deacetylase inhibitory activity in breast and cervical cancer cell lines. *Pharmacological Reports, 68*(6), 1102-1110. doi: 10.1016/j.pharep.2016.06.017

Silva, F. D., Rezende, C. A., Rossi, D. C. P., Esteves, E., Dyszy, F. H., Schreier, S., Gueiros-Filho, F., Campos, C. B., Pires, J. R., Daffre, S. (2009). Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *The Journal of Biological Chemistry, 284*(50), 34735-34746. doi: 10.1074/jbc.M109.016410

Simons, S., de Sá Júnior, P. L., Faria, F., de Fátima Correia Batista, I., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., Chudzinski-Tavassi, A. M. (2011). The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 65*(6), 443-450. doi: 10.1016/j.biopha.2011.04.030.

*SlideShare*. (2019). 04.03.2019 tarihinde https://www.slideshare.net/richardhastings589/kumc-measuring-apoptosis-using-flow-cytometry adresinden erişildi.

Slovak, M., Štibraniova, I., Hajnická, V., Nuttall, P. A. (2014). Antiplatelet-derived growth factor (PDGF) activity in the saliva of *Ixodid* ticks is linked with their long mouthparts. *Parasite Immunology, 36*(1), 32-42. doi: 10.1111/pim.12075.

Sousa, A. C. P., Oliveira, C. J. F., Szabo, M. P. J., Silva, M. J. B. (2018). Anti-neoplastic activity of *Amblyomma sculptum, Amblyomma parvum* and *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva on breast tumor cell lines. *Toxicon, 148*, 165-171. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.04.024.

Sterba, J., Dupejova, J., Fiser, M., Vancova, M., Grubhoffer, L. (2011). Fibrinogen-related proteins in *Ixodid* Ticks. *Parasites & Vectors, 4*(127), 1-10.

Şen, E., Masuzawa, T., Kadosaka, T., Fukui, T., Ohashi, N. (2011). First Demonstraton of *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks sampled from Northern Turkey and İstanbul Metropolitan Area. *Ticks and Tickborne Diseases, 2*, 94-98.

Şen (Güner), E., Watanabe, M., Kadosaka, T., Polat, E., Gargılı, A., Gülanber, A., Ohashi, N., Kaneda, K., Masuzawa, T. (2004). Seroepidemiology of *B. burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in Northern Turkey. *Epidemiology and Infection, 133*(2), 331-336.

Şen (Güner), E., Hashimoto, N., Kadosaka, T., Imai, Y., Masuzawa, T. (2003). A novel, fast growing *Borrelia sp.* isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *Microbiology, 149*, 2539-2544. doi: 10.1099/mic.0.26464-0

Şen (Güner), E., Hashimoto, N., Takada, N., Kaneda, K., Imai Y., Masuzawa, T. (2003). First isolation and characterization of *B. burgdorferi* sensu lato strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey. *Journal of Medical Microbiology, 52,* 807-813.

Şen (Güner), E., Watanabe, M., Hashimoto, N., Kadosaka, T., Kawamura, Y., Ezaki, T., Kawabata, H., Imai, Y., Kaneda, K., Masuzawa, T. (2004). *Borrelia turcica* species novo isolated from hard tick, *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54,* 1649-1652. doi: 10.1099/ijs.0.03050-0

Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell, 126*(4), 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024

Tanaka, T., Fujisaki, K. (2013). Tick lysozymes. A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (syf.774-750). İspanya, Badajoz: Formatex.

*The TickApp for Texas and The Southern Region*. (2011). 04.03.2019 tarihinde http://tickapp.tamu.edu/tickbiology.html adresinden erişildi.

*TickEncounter Resource Center*. (2018). 04.03.2019 tarihinde https://tickencounter.org/tick_identification/brown_dog_tick adresinden erişildi.

Tilgen, C. (2010). *Çorum İli Civarında Yayılış Gösteren Kemiricilerde (Ordo: Rodentia) Kene Enfestasyonunun ve Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Taşıyıcılığının Araştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Ankara Üniversitesi /Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Todaro, G. J., Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Journal of Cell Biology*, *17*(2), 299-313.

*Trakyanet*. (2019). 04.03.2019 tarihinde http://www.trakyanet.com/trakya/edirne/edirne/edirne-merkez-koyleri.html adresinden erişildi.

Uçbek, A. (2012). *Metftormin Nöronal Hücre Kültüründe Proliferasyon ve Apoptosis Üzerine Etkisi*. (Yüksek lisans tezi). Abant İzzet Baysal Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bolu.

*Wikivisually*. (2019). 04.03.2019 tarihinde https://wikivisually.com/wiki/Mouse_embryonic_fibroblast adresinden erişildi.

Xu, J. (2005). Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Current Protocols in Molecular Biology*, *28*(1), 1-8. doi: 10.1002/0471142727.mb2801s70.

Yalçın, M. (2014). *İdrar Yolu Enfeksiyonlarına Neden Olan Escherichia coli İzolatlarına Karşı Bazı Bitki Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktiviteleri*. (Yüksek lisans tezi). Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir.

Yay, M. (2004). *Kayseri Yöresinde Sığır ve Koyunlarda Kene Türlerinin Araştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Erciyes Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.

Yaylalı, C. (2007). *Tendnon Kılıfı Fibrobastlarının Hücre Kültüründe Tenositlere Farklılaşması ve Tenositlerin Sentezlediği Kollajen Tiplerinin Belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Hacettepe Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Yılmaz, A. B. (2010). *Van ve Erciş Yöresinde Evcil Hayvanlarda Kene Faunasının Belirlenmesi*. (Doktora tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.

Yılmaz, M., Beyatlı, Y. (2003). *Bacillus* cinsi bakterilerde antimikrobiyal aktivite ve antibiyotik üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, *1*(7), 35-49.

Yu, D., Liang, J., Yu, H., Wu, H., Xu, C., Liu, J., Lai, R. (2006). A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *343*(2), 585-590. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.188

# ÖZGEÇMİŞ

**Kişisel Bilgiler:**

**Doğum Tarihi :** 10.04.1987
**Doğum Yeri :** Erzurum/İspir
**Uyruğu :** T.C.
**Yabancı Dili :** İngilizce

**Eğitim Durumu:**

**1993-1994** İstiklal İlköğretim Okulu/EDİRNE

**1994-2001** Kurtuluş İlköğretim Okulu/EDİRNE

**2001-2005** Edirne Lisesi/EDİRNE

**2005-2009** **Lisans**, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü/ÇANAKKALE

**2009-2010** **Tezsiz Yüksek Lisans,** Trakya Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanlar Eğitimi A.B.D., Biyoloji Öğretmenliği/EDİRNE

**2010-2012** **Yüksek Lisans,** Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D/EDİRNE (***Tez konusu:*** Edirne İlindeki Çevresel Sular ve İçme-Kullanma Sularının Bakteriyolojik Ames Testi ile Mutajenitelerinin Araştırılması)

# TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

**Etkinlik/Katılım:**

**11/05/2009-12/05/2009** "Türkiye'de Biyoteknoloji Sektörü ve Kariyer Fırsatları Sempozyumu", Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi/ÇANAKKALE

**03/09/2012-07/09/2012** "21. Ulusal Biyoloji Kongresi", Ege Üniversitesi/Fen Fakültesi/İZMİR

**Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler**

Soylu H. ve E. Şen ''Edirne İlindeki Çevresel Sular ve İçme-Kullanma Sularının Bakteriyolojik Ames Testi ile Mutajenitelerinin Araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Kongresi P-21, Kuşadası, 2012

Soylu H. ve E. Şen "Edirne İlindeki Yüzeysel Suların Bakteriyolojik Ames Testi ile Mutajenitelerinin Araştırılması." XI. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi

**Projeler**

Edirne İlindeki Çevresel Sular ve İçme-Kullanma Sularının Bakteriyolojik Ames Testi ile Mutajenitelerinin Araştırılması. TÜBAP. 2010-2012

Edirne İli'nde Bulunan *Dermacentor marginatus* ve *Hyalomma aegyptium* Türü Sert Kenelerin *in vitro* Biyojenik Aktivitelerinin Araştırılması. TÜBAP. 2014-2017