



**PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİNE UYGULANAN
KENE TÜKÜRÜK SALGISININ HÜCRE CANLILIĞI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

BİNNUR SEYHAN

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman: Doç. Dr. DUYGU YAŞAR ŞİRİN
2023**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİNE UYGULANAN KENE TÜKÜRÜK SALGISININ
HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

BİNNUR SEYHAN

ORCID: 0000-0002-3976-3369

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

TEMMUZ-2023
Her hakkı saklıdır.

ÖZET

PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİNE UYGULANAN KENE TÜKÜRÜK SALGISININ HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Binnur SEYHAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Kene ısırıkları ağrısız ve kaşıntısız olduğu için fark edilmeleri zordur ve bu durumu tükürük içerisindeki proteinlere borçludurlar. Beslenme başladığında dokuda ağrıyı ve belli bir bölgede pıhtılaşmayı engelleyen enzimler, bağışıklık sistemini bloke etmek için histamine bağlanan ve histamini nötralize eden moleküller salgırlar. Kan Emilimi esnasında konak savunmasından kaçmak için immünomodülatör moleküller, yara iyileştirme inhibitörleri, analjezik faktörler, anti hemostatik ve anti-inflamatuvar faktörler içeren enzimleri üretirler. Primer hücreler doğrudan dokudan köken aldıkları için temsili amaçla kullanılmakta en iyi kültür hücreleridir. Yapılan bu yüksek lisans tez çalışmasında eski Çin kaynaklarında böbrekte yang eksikliği için kaplumbağa kabuğu tozu, Eski Mısır tıbbi bilgilerinde katarak tedavisi için kaplumbağa beyni ve Osmanlı'da baş ağrısı, felç gibi durumlarda kaplumbağa kanının kullanılması gibi sebeplerden dolayı *Hyalomma aegyptium* keneseinin yani yalnızca konakçı olarak kaplumbağayı tercih eden bu kene türünün tükürük bezi; dokuyu temsil edebilen primer hücre türlerinden AF/NP ve kıkırdak hücreleri üzerinde çalışılmıştır. MTT analizi, AO/PI boyama ile AF/NP ve kıkırdak hücrelerinde, kene tükürük bezinin hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve yara onarma etkileri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kene tükürük bezi, AF/NP hücresi, Kıkırdak, Hücre Canlılığı, Yara İyileşmesi, Hücre Proliferasyonu

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECTS OF TICK SALIVA APPLIED TO PRIMARY CELL CULTURES ON CELL VIABILITY

Binnur SEYHAN

Department of Biology

MSc. Thesis

Supervisor: Assoc.Prof. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Tick bites are painless and non-itchy, they are difficult to detect and owe this to proteins in saliva. When nutrition begins, enzymes that prevent pain and coagulation in a certain area in the tissue release molecules that bind to and neutralize histamine to block the immune system. During blood absorption, they produce enzymes including immunomodulatory molecules, wound healing inhibitors, analgesic factors, anti-hemostatic and anti-inflammatory factors to evade host defense. Since primary cells originate directly from the tissue, they are the best culture cells to be used for representative purposes. In this master's thesis study, the *Hyalomma aegyptium* tick, that is, the turtle as a host only, was used for reasons such as tortoise shell powder for yang deficiency in the kidney in ancient Chinese sources, turtle brain for the treatment of cataract in Ancient Egyptian medical information, and the use of turtle blood in cases such as headache and paralysis in the Ottoman Empire. salivary gland of this tick species that prefers; AF/NP and cartilage cells, which are primary cell types that can represent the tissue, were studied. With MTT analysis, AO/PI staining, AF/NP and cartilage cells, cell viability, cell proliferation and wound repair effects of the tick salivary gland were examined and evaluated.

Keywords: Tick salivary gland, AF/NP Cell, Cartilage, Cell Viability, Wound Healing, Cell Proliferation

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TEŞEKKÜR	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti	2
1.1.1. Keneler	2
1.1.1.1. Kenelerin biyolojisi	2
1.1.1.2. Kene taksonomi ve filogenisi	2
1.1.1.3. Kaplumbağa kenesi (<i>Hyalomma aegyptium</i>)	4
1.1.1.4. Kene-konak ilişkisi	5
1.1.1.5. Kene tükürüğü içeriği	6
1.1.1.6. Kene tükürüğüyle ilgili yapılan çalışmalar	10
1.1.1.7. Primer hücre	13
1.1.1.8. Annulus Fibrosis/Nükleus Pulposus (AF/NP) hücreleri	15
1.1.1.9. Kondrosit hücreleri	15
1.2. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı	16
2. MATERYAL METOT	20
2.1. Kullanılan cihazlar	20
2.2. Kullanılan kimyasallar	20
2.3. Kullanılan kitler	21
2.4. Besiyerinin hazırlanması	21
2.5. Kullanılan solüsyonlar	21
2.6. Yöntemler	21
2.6.1. Çalışmada kullanılan kenelerin toplanması ve diseksiyonu	21
2.6.2. Kene tükürük lizatı hazırlanması	24
2.6.3. Tükürük bezi ekstraktındaki protein konsantrasyonunun belirlenmesi	24
2.6.4. Standart grafik hazırlanışı	25
2.6.5. Tükürük lizatlarında protein miktar tayini	26

2.6.7. Protein profilinin belirlenmesi	26
2.6.7.1. Kullanılan solüsyonlar	26
2.6.7.2. Jel hazırlığı	27
2.6.8. Hücre kültürü uygulamaları	27
2.6.8.1. Hücre sayımı	28
2.6.8.2. Kene tükürüğünün kültürle uygulanması	28
2.6.8.3. MTT [3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] hücre canlılık analizi	28
2.6.8.3.1. MTT solüsyonu hazırlama	29
2.6.8.4. AO (Acridine Orange) / PI (Propidium Iodie) boyama	29
2.6.8.4.1. AO/PI solüsyonu hazırlama	29
2.6.8.5. Yara iyileşmesi	30
3. BULGULAR	31
3.1. MTT hücre canlılık analizi.....	31
3.2. AO/PI boyama sonuçları	32
3.3. Yara iyileşmeleri	33
3.3.1. AF/NP hücreleri	33
3.3.2. Kondrosit hücreleri	34
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. AF/NP hücrelerinde MTT analiz sonuçları	31
Çizelge 3.2. Kondrositlerde MTT analiz sonuçları.....	31



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Doymuş <i>Hyalomma aegyptium</i>	4
Şekil 1.2. Kene-konak etkileşimi	6
Şekil 1.3. Kene tükürük bezi	9
Şekil 2.1. Toplanan kenelerin tutulduğu kaplar	21
Şekil 2.2. Grup olarak ayrılan keneler ve diseksiyon sırasında kullanılan malzemeler	23
Şekil 2.3. Kene diseksiyonu	24
Şekil 2.4. Tükürük bezleri, bağırsaklar	24
Şekil 2.5. Sigma plot programı kullanılarak elde edilen standart grafik	25
Şekil 2.6. Biyogüvenlik kabiniinde yaraları açılmış 6 well plate içerisindeki hücreler	30
Şekil 2.7. Mikroskop altında açılan yara görüntüsü	30
Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda kene tükürüğü uygulanmış AF/NP hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri	32
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda kene tükürüğü uygulanmış kondrosit hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri	32
Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda kene tükürüğü uygulanmış AF/NP hücrelerinde yara iyileşmeleri	33
Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlarda kene tükürüğü uygulanmış kondrosit hücrelerinde yara iyileşmeleri	34

SİMGELER DİZİNİ

β	Beta
α	Alfa
ml	Mililitre
μm	Mikrometre
nm	Nanometre
mM	Milimolar
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
$^{\circ}\text{C}$	Derece Santigrat
μg	Mikrogram
μt	Mikrotesla
μl	Mikrolitre
M	Molar
L	Litre
g	Gram
mA	Miliamper

KISALTMALAR DİZİNİ

Ado	Adenozin
AF/NP	Annulus Fibrozis/Nükleus Pulposus
AO/ PI	Acridine Orange/ Propidium Iodie
APC	Antijen Sunan Hücreler
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Kompleman
CD	Kosimülatör
CEP	Kıkırdaklı Uç Plaklar
CO ₂	Karbondioksit
CTG	Kardiyotografi
DC	Dentritik Hücre
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medium'u
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EKH	Embriyonik Kök Hücre
ELİZA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi
ERK	Ekstrasellüler Sinyal Düzenlemeli Kinaz
ESM	Ekstrasellüler Matriks
FBS	Fetal Sığır Serum
IgE	İmmunoglobulin E
IgG	İmmunoglobulin G
IL	İnterlökin
İVD	İntervertebral disk
LPS	Lipopolisakkarit
MAC	Zar Saldırı Kompleksi
MHC	Majör Histokompabilite kompleksi
OD	Optik Densite Değeri
OmCI	Kompleman Tamamlayıcısı
PBS	Fosfatlı Tuz Tamponu
RNA	RiboNükleikAsit
SAT	Tükürükle Aktive Olan İletim
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SGE	Tükürük Bezi Enzimi

TAP	Serin Proteaz İnhibitörü
TCR	T Hücresi Reseptörü
TEMED	N’N’N’N’-Tetrametiletildiamine



TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca hem maddi hem manevi desteklerini esirgemeyen elleri hep üzerimde olan canım ailem; annem Berrah SEYHAN, babam Erdal SEYHAN ve abim Onur SEYHAN'a;

Yüksek lisans sürecimde akademik bilgi ve birikimini paylaşmaktan, maddi ve manevi desteklerini göstermekten çekinmeyen süreç boyu ve sonrasında da ablam olmaya devam eden Dr. Hande AKALAN'a; gösterdiği dostluk ve sevecenlikten ötürü Uzm. Aslı AKYÜZ'e;

Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan hocalarıma;

Maddi manevi desteğini her türlü gösteren, güler yüzlü saygıdeğer hocam Prof. Dr. Deniz ŞİRİN'e; tez çalışmasının başlangıcı ve devamında büyük katkısı olan, bilgi birikimini aktaran ve esprili mizacıyla motivasyon kaynağı olan Prof. Dr. Sırrı KAR'a; maddi manevi her türlü desteğini göstermekten kaçınmayan Dr. Öğr. Üyesi Muazzez GÜRGAN'a; pozitif enerjisiyle destek olan Prof. Dr. Türker BİLGİN'e;

Yüksek lisans ve tez danışmanım olan süreç boyu maddi manevi, bilgi birikimini her türlü paylaşıp destek olan yalnızca hocam olmakla kalmayıp arkadaş gibi olan yaklaşımlarından dolayı, öğrencisi olmaktan her daim gurur ve onur duyacağım çok saygıdeğer hocam Duygu YAŞAR ŞİRİN'e teşekkür ederim.

Binnur SEYHAN

Biyoteknolog

1. GİRİŞ

Primer hücreler uygun şartlar altında gerekli sıcaklık ve besinin bulunduğu büyüme faktörlerini de içeren besiyeri içinde *in vitro* koşullarda çoğaltılmasına doku kültürü adı verilir. Primer hücreler ilgili organ ya da dokudan alınarak enzimatik ayrıştırılmasıyla izole edilip kültüre edilir. Primer hücreler kullanım açısından kolay ve ekonomiktir. En büyük avantajı ise *in vivo* olarak organlara en yakın özellikleri göstermesi dolayısı ile ilaç ve kimyasalların toksik etkilerinin hücresel düzeyde gösteriminde en iyi veriyi sağlamasıdır (Zhaohui, 2019).

Vücudun en önemli desteği olan omurga kemik yapılarının birbirine bağlanmasını sağlar. Omurlar arasında intervertebral diskler mevcuttur (DeSai, Reddy ve Agarwal, 2021). Her disk 3 ana bileşeni vardır bu bileşenlerde nükleus pulposus (NP), annulus fibrozis (AF) ve kıkırdaklı uç plaklar (CEP) vardır. Kollajence zengin bir yapıda olup intervertebral diske besin taşınmasını destekler (Moon vd., 2013). Disk içerisinde jele benzeyen bir yapıya sahiptir. %66-86 su ve tip II kolajenden meydana gelir (Waxenbaum, Reddy, ve Fatterman, 2022).

Kıkırdak hücreleri (kondrositler) embriyoda iskelet eleman gelişimi sırasında şablon görevine sahiptir. Yetişkinlerde mekanik destek, büyüme ve hareket için önemlidir. Kondrositler hücre dışı matris içerisinde izoledir. Besin ve atık değişimi difüzyon ile gerçekleşir (Archer ve Francis-West, 2003). Kondrositler avasküler bir doku olan eklem kıkırdaklarını oluşturur. Ana görevi mekanik destek sağlamak olan kıkırdak doku yoğun ekstraselüler matriks içerir ve bu durum eklem fonksiyonu ile ilişkilendirilmektedir (Stockwell, 1979).

Kan emici ektoparazit olarak tanımlanan keneler; Argasid (yumuşak keneler) ve ixodid (sert keneler) olarak iki gruba ayrılabilirler (Nuttall, 2019). Üç konaklı hayat döngüsüne sahip olan *Hyalomma aegyptium*'da ixodide gruba dahildir. Genelde kaplumbağalar olmak üzere diğer sürüngenlere de konakçı olurlar. *Testudo* cinsi kaplumbağalar bu tür keneler için yetişkin evre konağıdır (Güner, Hashimoto, Kadosaka, Imai ve Masuzawa, 2003).

Bu çalışmada *Hyalomma aegyptium* kenesinin tükürük bezi ekstraktlarının insan AF/NP hücreleri ve kıkırdak dokusundan oluşturulan primer hücre kültüründe proliferasyon ve hücre canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır.

1.1. Literatür Özeti

1.1.1. Keneler

Keneler küçük örümceğimsilerdir. Bilimsel olarak *Arachnida* olarak sınıflandırılırlar. Yaşam döngüleri için kanla beslenme ihtiyaçları vardır. Kenelerin 90 milyon yıl dünyada olduğu fosil kayıtlarla belgelenmiştir.

Kenelerin yumurtaları, larvaları, nimfleri, yetişkin erkek ve dişi keneleri içeren karmaşık bir yaşam döngüsü vardır. Larvalar, nimfler (tohum keneleri olarak da adlandırılır) ve yetişkinlerin hepsinin kana ihtiyacı vardır. Keneler zıplamaz, uçmaz veya düşmez. Sadece bacaklarıyla uzanırlar ve bir konakçıya tutunurlar. Birkaç larval kene türü dışında, olgunlaşmamış evreler (larvalar, nimfler) genellikle kan emdikleri yer konusunda daha az seçicidirler. Yılanları, amfibileri, kuşları ve memelileri ısırdıkları bilinmektedir. Larvalar çok küçüktür (altı ayaklı yaklaşık 1/32 inç), nimfler sekiz bacaklı yaklaşık 1/16-1/8 inç ve yetişkinler sekiz bacaklı yaklaşık 3/16-1/4 inçtir (Davis, 2021).

1.1.1.1. Kenelerin biyolojisi

Keneler kan emici ektoparazit grubunda yer alır. İki genel kene grubu vardır argasid (yumuşak keneler) ve ixodid (sert keneler). Her grubun üyeleri farklı konakçılarla beslenir. Tanımlanan türlerin yaklaşık %10'u konakçı ayırt etmez. Bu genel beslenme sebebiyle konakçıda hastalıklara sebep olabilirler. *Lyme borreliosis* gibi birçok hastalık kenelerle ilişkilendirilmiştir. Keneler patojenlere vektör olarak hizmet edebilir. Kenelerin tükürük bezlerinin fizyolojisi ve toksin madde içerebileceği sebebiyle kenelerin yalnızca beslenmeleri bile hastalığa sebep olabilir. Ayrıca keneler farklı patojen türlerini (virüs, riketsiya, spiroket, bakteri, mantar, protozoa, filaryal nematod) iletir ve bu konuda sivrisinekleri geride bırakırlar.

Kenelerin azaltılması ve kontrolü, zararlı türlerin bulunabileceği farklı habitat türleri nedeniyle kovucu ve akarisit kullanımını da içeren geniş bir yaklaşım gerektirir. Moleküler genetiğin ortaya çıkışı ve immünolojideki kullanışlılığıyla yaygın zararlı türler için kene aşılı gelişmektedir (Cupp, 1991)

1.1.1.2. Kene taksonomi ve filogenisi

Keneler, örümcekler ve akreplerle bağlantılı eklembacaklılardır. 702'si ixodid keneler (family, Ixodidae), 193'ü yumuşak keneler (family, Argasidae) ve Nuttalliellidae'de tek bir tür

bulunan yaklaşık 900 kene türü bilinmektedir. Sert keneler ve yumuşak keneler farklı yaşam döngülerine sahiptir, her aşamada büyür ve görünümünü değiştirir (Nuttall, 2019).

Keneler, akarlara mensup hayatta kalmaları için kan emici araknid ektoparazitler ve çeşitli patojen barındıran vektörlerdir. Hala daha birkaç tür kenenin sistematığı tartışma konusudur. Memeliler, kuşlar, sürüngenler dahil çok çeşitli omurgalı türleriyle beslenebilen canlılardır.

Akar vücudu prosoma (cephalothorax) ve opisthosoma (abdomen)'dan oluşmuştur. Ağız kısmı gnathosoma ve kalan kısım ise idiosomadan meydana gelmiştir. Bacak kısımları podosoma, diğer parçalarsa idiosoma adına sahiptir. Ön iki bacak prodosoma, geride kalan kısım ise hysteresomadır. Arka kısımda bulunan bacaklar ise metapodosomadır.

Yumurtadan çıkmalarıyla beraber 3 dönem (sırayla larva, protonimf ve deotonimf) geçirdikten sonra ergin hale ulaşmış olurlar. Akar sınıfında yaklaşık 30.000 tür bulunmaktadır (Wang, Zhang, Pei, Yu, ve Liu, 2019).

Yumuşak keneler, larva hariç gnathosoma vücut içinde ventralinde bulunur, scutum bulunmamaktadır, coxa'nın yanında bir, bazen iki göz bulunur (Akça, 2019). Yumuşak keneler sklerotize skutum ve anteroventral bileşimli ağız parçalarına sahip değildir (Wang vd., 2019). Yumuşak keneler (Argasidae), sert keneler gibi bir yumurta olarak başlar, bir larvaya dönüşür, beslenir ve sonra bir nimfe dönüşür. Nymphal yumuşak keneler, her döngüde bir konak gerektiren nimfler gibi yedi aşamadan geçebilir. Yumuşak kenelerin yaşam döngüsü, türlere bağlı olarak aylardan yıllara kadar sürer. Isırık tipik olarak ağrısızdır ve sadece 15-30 dakika sürer, bu da tespit edilmesini zorlaştırır (Anonim, 2021b).

Sert kenelerin, bütün gelişim evreleri gnathosoma vücut ön kısmında bulunan dorsalden görüntülenebilir. Idosoma dorsalinde bulunan scutum isimli bir levha bulunmaktadır. Scutum'un iki tarafında, birer adet göz bulunur (Akça, 2019). Sert keneler larva dışında tüm yaşam süreçlerinde sklerotize bir skutuma ve apikal yerleşimli bir gnathostoma sahiptir, genelde birkaç gün ve çok miktarda kan alırlar (Wang vd. , 2019). Sert keneler (Ixodidae), yetişkin bir dişi kene tarafından bırakılan bir yumurta olarak hayat döngüsüne başlar. Yumurtadan çıktıktan sonra konak bulması ve beslenmesi gerekir. Beslendikten sonra konaktan yere düşer ve bir nimf olarak ortaya çıkarak bir deri değiştirme sürecinden geçer. Sert kenelerin yaşam döngüsü, türe bağlı olarak bir ila iki yıl sürer (Anonim, 2021b).

Nuttalliella namaqua, Nuttalliellidae familyasında eşsiz bir türdür. Sert ve yumuşak kenelere benzer özellik gösterir ve yumuşak keneler gibi hızlı kan emme potansiyeline sahiptir (Wang vd., 2019).

Kenelerin ağız kısmında 1'er tane chelicera ve 1'er tane pedipalpeye ek hypostom mevcuttur. Chelicera da konakçıya yapışmak için kesimi ya da delmeyi sağlayan dişe benzer uzantılar bulunur. İlave olarak keneler beslenme sırasında bir salgı salarak kan pıhtılaşmasına ve kesme esnasında konakçının acı duyumunu engellerler (Akça, 2019).

Keneler beslenmeden bir veya daha fazla yıl hayatta kalabilir. Sert keneler bu konuda daha dirayetlidirler. Hastalık bulaşımı genellikle kene beslenmesini tamamladığı sırada gerçekleşir. Sert kenelerde patojenlerin aktarımı saatleri alabilir.

Yumuşak keneler genelde bir saatten az beslenme süresine sahiptir. Bu yüzden de hastalık bulaştırmaları dakika kadar kısa bir süreye sahiptir. Yumuşak kenelerde ısırma ağrılı tepkiler üretebilir.

1.1.1.3. Kaplumbağa kenesi (*Hyalomma aegyptium*)



Şekil 1.1. Doymuş *Hyalomma aegyptium*

Bu kene türü klasik üç konaklı hayat döngüsündedir. Kaplumbağa ve diğer sürüngenlere yapışır. Genel olarak güneybatı-orta Asya'da, kuzey-güney Afrika'da, Güney Avrupa ve Orta Doğu'da bulunur. *Testudo* cinsi kaplumbağalar *H. aegyptium*'un yetişkin evre konaklarıdır. Kaplumbağa dışında kertenkele, yabani tavşan, bazı kemirgenler, keklikler, kirpiller ve ayrıca insanlardan beslenebilir (Güner vd., 2003).

Hyalomma aegyptium morfolojik olarak *Hyalomma marginatum*'a benzer, orta ila büyük boyutlarda olan bir türdür. Dişiler 5,5-6,5 milimetre uzunluğunda; erkekler ise 3,8-5,6 milimetre arasında değişen boyutlarda görülürler. Kurak habitatlara uyum sağlamışlardır. Genel olarak insanlar ve hayvanlarda vektör olarak işlev görmezler (Messner ve Antwerpes, 2019).

Türün yetişkinler için genelde konakları *Testudo* türünün *Palearktik* kaplumbağalardır. Olgunlaşmamış *H. aegyptium*, patojen transferinde eko-epidemiolojik problem teşkil eden konakçılarla beslenebilir. Dolayısıyla çeşitli antijenik ajan vektör kaynağı olabilirler. *Ehrlichia* ve *anaplasma* akut ateşli hastalıktan, türe göre değişen çoklu organ yetmezliğinden karakterize fulminan hastalığa kadar çeşitli belirtilere sebep olan hastalıklara yol açabilir bu sebeple dünya genelinde bir dağılıma ve zoonotik potansiyelli kaynaklardır (Barradas vd., 2020). *Hyalomma aegyptium*'a ait görsel şekil 1.1.'de verilmiştir.

1.1.1.4. Kene-konak ilişkisi

Keneler konakçıya yapışma esnasında, konak kan kaybını önlemek için bir savunmaya geçer. Kaşıntı ve ağrıya sebep olan bir iltihaplanma durumu, pıhtılaşma ve bağışıklık sistemiyle karşı karşıya gelir. Bu duruma karşılık olarak keneler beslenme sırasında konağın tepkisini kısıtlamak için biyoaktif lipid ve proteinlerden meydana gelen karmaşık bir salgı geliştirmişlerdir. Yapılan son çalışmalarda sert kenelerin tükürük bezlerine bakıldığında işlevi henüz bilinmeyen birçok yeni protein keşfedilmiştir (Francischetti, Sá-Nunes, Mans, Santos, ve Ribeiro, 2009).

Kenelerin konakçıya bağlandığı kısım konak ve konakçı arasında patojenler için kritik bir bölgedir. Bağlanılan kısımda kene tükürüğü sebebiyle salgılanan moleküller büyük oranda değişir. Bu olay tükürükle aktive olan iletim (SAT) ismiyle anılır. Biyoaktif kene tükürük molekülleri konakçı üzerindeki immünolojik olayları baskıladığı sırada kene kaynaklı iletilen ajanları destekler. SAT bileşenleri farklı konak ve farklı konakçılara göre değişiklikler göstermektedir (Nuttall ve Labuda, 2004).

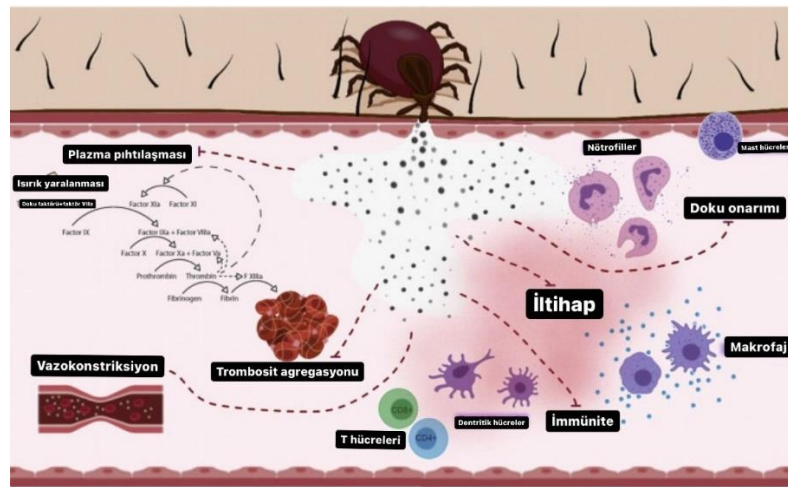
Kene ağız parçasının vücuda girmesiyle birlikte vücutta pıhtılaşma gerçekleşir. Konak cevabı derinin yarılmasıyla beraber hızlı lökosit infiltrasyonunu içeren bir inflamatuvar yanıt verir. Endotel, mast, dentrik hücreleri, keratonositler, makroplar ve lökositler kene tükürüğü veya ağzıyla temas kurduğunda aktif hale gelirler. Kene yapışmasıyla beraber interlökin-8, tümör nekroz faktörü, ve interlökin-1β gibi kemokin ve sitokinler saldırıya geçerler (Wikel, 2013).

Aktive edilen T ve B hücreleri, özel sitokinlerle immünolojik yanıtı oluşturarak kene kaynaklı antijenlere karşı antikor üretimine geçerek immün yanıtı güçlendirirler (Bowman ve Nuttal, 2008). Kene-konak ilişkisi yalnızca beslenmekle yeterli kalmayıp aynı zamanda kene bağışıklık mekanizmasını da etkilemektedir. Konak bağışıklığının gücüyle beraber kene bağışıklık mekanizması da gelişmektedir. Dolayısıyla kene-konak etkileşimi yeni bağışıklık mekanizmalarıyla beraber sürekli değişerek stratejik bir hale gelmektedir (Andrade, Teixeira, Barral ve Barral-Netto, 2005).

Kene-konak arasındaki immünolojik birleşimler, istila karşısında konak savunması ve kene karşısından gelen baskılayıcı önlemler içerirler. Kene istilası karşısında gösterilen direnç; hüморal ve immünolojik, efektörleri içerir. Keneler antijenik hücreleri ve spesifik T hücrelerinin ürettiği antikor karşılığını baskılayarak yanıt verirler. Kene aracılığıyla bulaşan hastalıklarda hastalığa sebep olan ajanlar, kene konakçının immünolojik cevabını baskıladığı sırada bulaşır (Wikel ve Bergman, 1997).

Düşük moleküler ağırlığa sahip olan serin proteaz inhibitörü (TAP), yumuşak keneden saflaştırılmıştır. Peptid, faktör Xa'ya özgül, yavaş ve sıkı bağlanan bir inhibitördür. Ayrıca *in vitro* olarak çeşitli insan plazma pıhtılaşma analizlerinde antikoagülan görevi görür. Amino asit dizisi Kunitz tipi inhibitörlerle sınırlı homolojiye sahiptir. Bunun yanı sıra, diğer inhibitörlerin aksine, TAP sadece faktör Xa'yı inhibe eder. TAP'ın özgüllüğü ve boyutu bir antikoagülan olarak terapötik değere sahip olabilir (Vlasuk vd., 1991)

1.1.1.5. Kene tükürüğü içeriği



Şekil 1.2. Kene-konak etkileşimi (Martins, Kotál, Bensaoud, Chmelař, ve Kotsyfakis, 2020)

Tükürük bezlerinin kene içinde yanal alanları bulunmaktadır. Kafatasından geçen bir ana tükürük kanalı bulunmaktadır. Tükürüğün hem dışa hem de konaktan gelen kanı içe aktardığı bir alan bulunur. Kan alımı ve tükürüğün çıkışı ağız parçaları ile gerçekleşir. (Steen, Barker ve Alewood, 2006)

Kene hipostomu konakçı derisine girmeye başlarken tükürük kanalları çalışmaya başlar, tükürük ağız parçalarının uç kısımlarına doğru gelmeye başlar. Kene beslenmeye başlamadan önce tükürük salgısı beslenme bölgesine aktarılır. Tükürük kanı sıvı halde tutar, inflamatuvar ve immün mekanizma reaksiyonlarını etkisiz hale getirir (Stone, Commins, ve Kemp, 1983). Kene-konak etkileşimine ilişkin görsel Şekil 1.2.'de verilmiştir.

Kene tükürüğü, kene konağa yapıştığı anda beslenme bölgesine salgıladığı bir sıvıdır (Nuttall, 2019). Kene tükürüğünün, kan almaya yardımcı peptidik ve peptidik olmayan molekülleri içeren karmaşık bir yapısı vardır. Kene, konakçıya yapışıp beslenmeye başladıkça ve devam ettikçe kene tükürük bileşeni değişmeye başlar, konağın immün yanıtına karşılık yeni cevaplar geliştirir. Bazı keneler önemli risk taşıyan hastalıkların patojenlerini taşırlar. Kenenin beslenmeye başlaması ve konağın immün sistemine yanıtı esnasında tükürükte bulunan patojenler konağa iletmeye başlanır. Patojen iletimini sağlayan tek kaynak tükürük değildir. Kene tükürüğünde bulunan patojenler, tükürük destekli aktarım ile bulaş ve enfeksiyonu gerçekleştirmek için konak yanıt modülasyonunu kullanır (Nuttall, 2019).

Kene tükürük bezi salgıları, ektoparazitlerin uzun süre beslenebilmeleri ayrıca patojenlerin konakçıya iletiminde önemlidir. Ixodid kenelerin tükürük bezleri osmoregülatiktir. Konakçıya kandan çok su, tükürük yoluyla geri döner. Kene beslenmeye devam etmeli ve ağız, bağırsak kısımları sıvı kalmalıdır bu yüzden konağın bağışıklık sistemini kene tükürüğündeki anti-trombosit, agregasyon, antikoagülen ve anti-vazokonstriktörler gibi çeşitli etkenlerle önler. Kene, konakta uzun süre kalabilmek için tükürük bileşenleri immün yanıtı baskılar bu sırada da patojenlerin geçiş hızını arttırmış olur (Bowman, Coons, Needham, ve Sauer, 1997).

Kene tükürük bezi transkriptomunda konakçıya salgılanan proteinlerin önemli bileşeni olan protez inhibitörleri araştırılmıştır. Tükürükte üç ana proteaz inhibitör grubu bulunmaktadır: Bu inhibitörler kunitz inhibitörleri, serpinler ve sistatinlerdir. Kunitz inhibitörleri anti-hemostatiktir ve kunitze mensup birçok protein, konak pıhtılaşması veya trombosit agregasyonunu engellediği bulunmuştur. Serpin ve sistatinler anti-hemostatik

efektördür ancak garip olarak konakçı immün sisteminin de pluripotent modülatörü olarak da işlev görürler (Chmelař, Kotál, Langhansová, ve Kotsyfakis, 2017).

Kunitz'e dair proteinler hem yumuşak hem sert kenelerin tükürüklerinde yüksek miktarda bulunurlar en yüksek oranda bulunansa serin proteaz inhibitörleridir. Bu inhibitörün adı sığır pankreas tripsin inhibitöründen türetilmiştir (Ascenzi vd., 2003). Kunitz domaini genelde iki β -şeritinden ve bir α -sarmaldan meydana gelir ve altı korunmuş üç disülfid köprüsüyle stabildir (Creighton ve Charles, 1987). Kunitz domaini içeren proteinler alt sınıflara ayrılırlar. Birkaç Kunitz domaini içeren proteinler trombin, faktör Xa, faktör XIIa, tripsin ve elastaz üzerinde etki göstererek pıhtılaşma engelleyici olarak görev görürler (Maritz-Olivier, Stutzer, Jongejan, Neitz ve Gaspar, 2007).

Kenelerde bulunan serin proteaz inhibitörlerinin ikinci büyük ailesi serpin süper ailesidir. Bu protein ailesi omurgalılarda birçok fizyolojik olayı düzenlerler. Bu aileden bazı proteinler, omurgalılarda pıhtılaşmanın düzenleme işlevini yapar. Kene tükürüğünde bu tür proteinin olması konak hemostazının modülasyonunda katkı sağlayabilir (Chmelař, Calvo, Pedra, Francischetti ve Kotsyfakis, 2012).

Sistatin süper ailesinin; insanda da dahil olmak üzere birçok organizmada bulunan çok sayıda sistatin domeni içeren üyesi bulunmaktadır (Turk, Stoka, ve Turk, 2008). Kenede bulunan sistatinler, proteoliz, antijen işleme, bağışıklık sistemi geliştirme, epidermal homeostoz, iltihaplanma esnasında nötrofil kemotaksisi ve apoptoz dahil birçok konağın biyolojik evresini düzenleme yeteneğine sahiptir (Alexandra, James, ve Michalis, 2012). Kene sistatinleri hem sert hem yumuşak türlerde bulunur ve korunmuştur. Bu durum konak immünomodülatörleri olduğunu düşündürmüştür (Parizi vd., 2018).

Kene tükürüğünde bulunan pıhtılaşma önleyici enzimler, beslenme alanını korumaya ve bağırsakları sıvı halde tutmada katkı sağlar (Valenzuela, Charlab, Galperin, ve Ribeiro, 1998). Konağın verdiği immünolojik tepkileri düzenlemek için evrimsel süreçte ortaya çıkmış olabilecek enzimler bulunur. Bunlardan biri kininaz adı verilen bir enzimdir, bu enzimler kininleri özgül bir şekilde hidrolize eder (Riding vd., 1994).

Konakçı immuglobulin proteinleri, antikorları korurken ektoparazitlerin hemolenfine geçebilir. Yapılan araştırmada *Rhipicephalus appendiculatus* kenesinin beslenme esnasında immünoglobulin-G'yi tükürük yoluyla attığı görülmüştür. Kene hemolenfi ve tükürük

bezlerindeki immünoglobulin bağlayıcı proteinlerin bu durumu gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Wang ve Nuttall, 1999).

İşlevi henüz bilinmeyen veya karakterize edilmemiş proteinlere kene transkriptom çalışmalarında çokça rastlanır (Kotsyfakis, Schwarz, Erhart, ve Ribeiro, 2015). Homoloji göstermeyen, kene veya diğer eklem bacaklılarda bulunan bu orphan (öksüz) genlerin iki kaynağı olabilir; düşük kaliteli dizileme ve zayıf bağlanmalar. Bu yüzden klonlama, dizileme hataları veya çerçeve kayması nedeniyle de işlevsel olarak açıklanamayabilirler (Gibson, Smith, Fuqua, Clay, ve Colbourne, 2013).



Şekil 1.3. Kene tükürük bezi (Nuttall, 2019).

Kene tükürüğü şekil olarak mikroskop altında veya gözle bakıldığında üzüm kümelerine benzerler, acini olarak da bilinirler ve tükürük bezi tarafından üretilir (Kemp, Stone, ve Binnington, 1982). Kene tükürük bezine ait görsel Şekil 1.3.'te yer almaktadır. Kene tükürüğü; konakçı kanıdan gelen su ve iyonları, adenosin, prostagladinler, endokannabinoidler ve mikro RNA'lar gibi peptid olmayan molekülleri, variegins, hyalomins, ve madanins gibi kene peptidlerini, kitinazlar, müsinler, ikzostatinler, sistatinler, defensinler, glisin bakımından zengin hiyalürenidazlar, Kunitz domainleri, lipokalinler ve metalloproteazlar gibi kene proteinlerini, immünoglobulinler, haptoglobin ve transferrin gibi konak proteinlerini, miRNA, mRNA, peptit ve protein içerebilen eksozomları içerebilmektedir (Nuttall, 2019).

1.1.1.6. Kene tükürüğüyle ilgili yapılan çalışmalar

Keneler kan kaybı ve konakçının derisine hasar vermesi, beslenme sırasında patojen aktarımında vektör olmaları, bulaştırdıkları ajanlarla hayvanların ölümüne sebep açmalarından dolayı ekonomik kayıplara sebep olmalarıyla bilinirler. Keneler hayatta kalmak için konakçı savunma mekanizmasını tabiri yerindeyse savunmasız bırakıp onların kendi mekanizmalarına dahilmiş gibi düzenleyerek; hemostaz, iltihaplanma, immün sistem saldırılarını bloke ederek beslenirler. Dolayısıyla kenenin bu beslenme alanından faydalanmak isteyen patojenler keneye bulaşarak konakçıya geçiş yapmayı hedeflediler ve başarılı da oldular (Stibrániová, Lahová, ve Bartíková, 2013).

Pıhtılaşma faktörü XII aktivasyonu kenenin deri kesimi sırasında, ağrıya yol açan reseptörlere bağlı proinflamuar bir peptit hormon olan bradikinin salımına yol açar. Keneler anjiyotensin dönüştürücü enzim salgılayarak bradikinin salınımını bloke eder (Ribeiro ve Mather, 1998).

Endokannabinoidler, konaklarda olabilen kannabinoid reseptörlerine bağlanarak bunları aktive eden lipid araçlarıdır. Kısmen beslenen dişi kene tükürük ve tükürük bezlerinde endokannabinoidlerin ya da ilgili yağ asidi amidlerinin kenelerin varlığını gizlemek için analjezik etki gösterirler (Fezza vd., 2003). Ağrı kontrolünde kullanılabilecek diğer tükürük bileşenleri, farklı periferik reseptör aktivasyonuna bağlı analjezik ya da pronosiseptif etkilere sahip adenosin (Fontaine vd., 2011) ve miRNA'dır (Hackenberg ve Kotsyfakis, 2018).

Kene ısırması sonucu konağın ilk savunma hattı hemostazdır. Kenenin konakçıya dişlerini geçirmesiyle beraber kan kaybını önlemek için hemostaz devreye girer. Hemostaz üç mekanizmadan meydana gelir: fibrin pıhtılarının üretimine yol açan pıhtılaşma, trombosit agregasyonunun aracılık ettiği trombüs oluşumu ve yara iyileşmesi, yaralı bölgeye sınırlı kan akışına yol açan vazokonstriksiyon. Bu mekanizmalardan biri uyarılara yanıt olarak çeşitli yollarla aktive olur. Pıhtılaşmayı sağlamak için trombüs oluşumunda trombositleri destekleyen fibrin üretimi gerçekleşir (Mann, Butenas, ve Brummel, 2003).

Konak bağışıklığında hemostaz ve serin proteaz faaliyetleri birbirleriyle bağlantılı olsalar da kenelerin kaçmak için kullandığı moleküller vardır. Moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerle birlikte kene tükürüğünde bulunan moleküller farmakolojide kullanılmaya başlandı. Kene tükürük bezinde protein daha fazladır ve protein karakterizasyonu yapılmıştır. Tükürük bezinden rekombinant protein üretimi başlatılmıştır (Chmelar vd., 2012).

Yumuşak bir kene türü olan *Ornithodoros moubata* tükürüğünde FXa-kene antikoagülen peptidi serin proteaz inhibitörü bulunur. Bu antikoagülen insan plamazsında pıhtılaşma önleyici özel bir FXa inhibitörüdür (Waxman, Smith, Arcuri, ve Vlasuk, 1990). Rekombinant olarak elde edilen kene antikoagülen peptidi hayvanlarda test edilmiştir. Trombositleri hedefleyen tek zincirli antikora bağlandığında, antitrombotik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Vlasuk vd., 1991).

Keneler beslenmek ve konakçı immün sisteminden kaçmak için birçok moleküler bileşik geliştirmiştir (Kazimírová ve Štibrániová, 2013). Beslenmenin devam edebilmesi için; nötrofiller, B ve T hücreleri, dendritik hücreler gibi konakçının önemli savunma sistemlerinin hepsiyle mücadele ederler (Štibrániová, Lahová ve Bartíková, 2013). Monositler, nötrofiller, T lenfositler ve diğer hücrelerin tamamı kemokin adı verilen kemotaktik sitokin ailesi tarafından yönetilir. Kemokinler, sistein sayı ve düzenlerine göre dörde ayrılırlar (C, CC, CXC ve CX3C). İnsan kemokinleri CC veya CXC grubunda bulunur (Bachelierie vd., 2013).

Kemokin sisteminin çökmesi, kenelerin bağışıklık sisteminden kaçmasında önemli stratejilerinden biridir. Kemokin nötralizasyonu için kene tükürüğünde bulunan sisteince zengin kemokin bağlayıcı proteinler üretirler ve bunların homoloğu olan evasin memelilerde bulunmaz (Bonvin, Power, ve Proudfoot, 2016). Evasinler altı-sekiz sistein içerikli yapısal olarak alakasız iki C6 ve C8 alt grubuna ayrılabilir. Bu alt gruplar kemokinler için yüksek afiniteli bağlayıcılardır (Déruaz vd., 2008). Kene tükürük bezlerinde de evasin grupları tanımlanmıştır. İlk tanımlanan evasin kahverengi köpek kenesinden karakterize edilmiş Evasin-1'dir (Frauenschuah vd., 2007). Evasin-1 yüksek afiniteli kemokin bağlayıcıdır (Dias vd., 2009). Sonrasında tanımlanan Evasin-4, Evasin-1'e oranla daha seçicidir. Aktive trombositler tarafından en çok kodlanan kemokinlerden biri kemokin CC-motif ligandı 5 (CCL5, RANTES olarak da bilinir)'tir. Ateroskleroz gelişiminde belirgin bir rol oynar, iltihaplı endotelde monositlerin durmasına aracı olur (Bakogiannis, Sachse, Stamatelopoulos, ve Stellos, 2019). Evasin-4 ile tedavide anti-CCL5 aktivitesi nedeniyle farelerin kalp yaralanmasını ve iltihabını azalttığı görülmüştür (Braunersreuther vd., 2013).

Kompleman sistem, dokuya zarar veren veren iltihaplanmaya sebep olan yıkıcı bir efektör mekanizma görevi görür. Multipl skleroz, romatoid artrit, hemplitik üremik sendrom, paroksizmal noukturnal hemoglobinüri ve myastenia gravis benzeri hastalıklara dahil edilmiştir. Aynı zamanda transplantasyon, felç, kardiyopulmoner baypas ve miyokard

enfarktüste görülen iskemi-reperfüzyon hasarlarında ortaya çıkan hasarlardan sorumludur. (Harris, Fraser, ve Morgan, 2002).

Kompleman (C) sistemin düzensiz aktivasyonu inflamatuvar hastalıklara neden olmaktadır bu nedenle kompleman sistemi hedefleyen ve inhibe eden ajanlar araştırılmaktadır. Uzun süreli kronik hastalıklarda kompleman inhibisyonu, kompleks ve yabancı hücrelerin optimizasyonunu sağlayamaması ve patojenlerin lizisi sebebiyle immün hastalıklar güçlenir dolayısıyla bu durum bir dezavantaj oluşturur. Yumuşak kenenin (*Ornithodoros moubata*) tükürük bezinde tanımlanan C5 bağlayıcı proteinin (OmCI) fizyolojik evrelere etki etmeden inflamasyonu durdurabildiği gösterilmiştir. OmCI, kemirgenlere intravenöz olarak verildiğinde hemolitik aktiviteyi tamamen bloke ettiği ve C5 yeniden sentezinde restore olduğu gösterilmiştir. OmCI'nin Lewis sıçanlarında otoimmün bir hastalık olan miyastenia gravisini engellemede etkili görülmüştür. Nöro-kas'ta C3 ve C9'u azaltmış ve bu bölgede inflamatuvar hücre infiltrasyonu da azalmıştır. Bu nedenlerle kompleman aracılı hastalıklarda hedefe yönelik tedavi için umut verici olmuştur (Hepburn vd., 2007).

OmCI'nin terapötik kullanımında C sisteminde inhibisyon önemli bir aşamadır (Nunn vd., 2005). Mahaffey vd. yaptığı bir araştırmada kullanılan C5'e karşı insan antikoru, miyokard enfarktüsü ve paroksizmal noktürnal hemoglobinüri tedavisinde heyecan verici bulunmuştur (Mahaffey vd., 2006).

İnsan alerjik astım modeli farede Th2, CD4 T hücrelerinin aktivasyonunun alerjik astım hastalığını açığa çıkarmak için yeterli olduğu bulunmuştur. Bu hücrelerin aktivasyonun kontrolü sağladığında astım tedavisi için kapı açılmış olur. *Ixodes scapularis* türü keneler yenilenme sağlanana kadar 7 gün kadar konak üzerinde kalır ve beslenir, bu süreçte birçok immünosupresif protein salgılar. Ag kullanılarak duyarlı hale getirilmiş astım modeli farelerde *I. scapularis* türü kenelerden elde edilen tükürük salgısının içerdiği Salp15 proteininin Th2 hücrelerin başlattığı bağışıklık reaksiyon oluşumunu ve deneysel olarak astım gelişiminin önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Paveglio vd., 2007).

Ektoparazit kaynaklı patojenler ve sebep oldukları hastalıklardan koruma sağlamak için kene tükürük proteinleri kullanılarak aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. *Rhipicephalus appendiculatus* türü kenelerin tükürük salgısından elde edilen 64TRP proteininden üretilmiş aşı farelerde denenmiş ve *Ixodes ricinus* ile bulaşan kene sebepli ensefalit virüsüne (TBEV) karşı koruması test edilmiş; 64TRP aşısı farelerde keneler tarafından

ölümcül tehditlere karşı koruyucu olmuştur. Diğer bir aşı TickGARD kenenin orta bağırsağını hedef alarak kene beslenmesini engellemektedir. TickGARD aşısı patojen iletimini bloke edici aktivite göstermiş ancak tam olarak koruyucu görülmemiştir (Labuda vd., 2006).

Lyme hastalığına sebep olan ajan *Borrelia burgdorferi*'nin enfeksiyonu kolaylaştırmak için kene tükürük proteini olan Salp15'i kullanabileceği gösterilmiştir. Salp15'in daha sonra hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak spirokete yapıştığı ve spesifik olarak *B. burgdorferi* dış yüzey proteini C ile etkileşime girdiği gösterildi. Salp15'in bağlanması, *B. burgdorferi*'yi *in vitro* antikor aracılı ölümden koruduğu ve daha önce *B. burgdorferi* ile enfekte olmuş farelere veya hayvanlara aşılandıklarında spiroketlere belirgin bir avantaj sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca, salp15'in *I. scapularis*'te RNA interferans aracılı baskılanması ile kene kaynaklı spiroketlerin fareleri enfekte etme kapasitesini büyük ölçüde azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, bir patojenin, memeli konakçıda kolonize olmak için bir eklemabacaklı proteini kullanma kapasitesini göstermektedir (Ramamoorthi vd., 2005).

Adenozin, vücutta hipoksik koşullar ve akut veya kronik enflamatuar doku saldırıları gibi metabolik stres altında üretilen bir pürin nükleosiddir (Kumar ve Sharma, 2009). Bir immünomodülatör molekül olan adenozin kene tükürüğünde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Oliveira vd., 2011). Aynı zamanda bir vazodilatör olan adenozin trombosit agregasyonunu inhibe etme işlevi dışında bağışıklık sisteminin neredeyse tamamını modüle edebilmektedir (Collis, 1989).

1.1.1.7. Primer hücre

Hücrelerin uygun sıcaklık sağlandığı inkübatör ve gerekli besini içeren besiyeri ve büyüme faktörlerinin kullanılması, *in vitro* ortamda çoğaltılmasına doku kültürü denir. Primer kültür hücre çeşitlerinden herhangi birinin laboratuvar ortamında gerekli şartların sağlanmasıyla büyütüldüğü bir yöntemdir.

Primer hücreler veya birincil hücreler, çalışılacak organ veya dokudan enzimatik olarak ayrıştırılarak izole edilirler. Genel olarak birincil hücreler biyopsiden alınır ve doku alanını içeren karışık bir kültür içerir. Birincil hücreler fizyolojik olarak *in vivo* koşulları iyi bir şekilde taklit eder, optimal şartlarda dokunun tüm işlevlerini yerine getirmeleri beklenir. Doku biyopsisinden elde edilen hücrelerin genelde *in vitro* olarak yapışması ve çoğalması zordur bu sebepten birçok organ veya dokudan birincil hücre tipi izole edilememiştir. Kültürde birincil hücre tiplerinin zararına olacak olan fibroblast benzeri hücreler hızla genişler. *İn vitro* olarak

ayrıştırıldıktan sonra kültürlenmiş hücreler yaşlanma evresine geçmeden önce sınırlı bir sayıda bölünmeye uğrarlar (Kengla, Kidiyoor, ve Murphy, 2017).

Primer hücrelerin kullanımı kolay ve ucuzdur. Primer hücrelerin en büyük avantajı *in vivo* doku/organlara yakın fonksiyon ve fenotipi göstermesi; ilaçların ve toksik etkilerinin, hücresel düzeyde araştırılabilir olmasıdır. Örnek olarak karaciğerden izole edilen hepatositler, faz I ve II metabolik yollarının, ilaç metabolizmasında enzim ve toksik metabolit indüksiyonunu aktivitesini düzenlemede kullanılan bileşiklerin tanımlanmasında önemlidir. Sınırlı yaşam süresi, hızlı fenotipik değişiklikler, eksik hücre-hücre etkileşimi gibi durumlar hücre kültürü modellerinin kullanımındaki dezavantajlar olarak bildirilmektedir (Zhaohui, 2019)

Hastalardan elde edilen primer hücreler, deneyler için en uygun hücre tipidir ancak kullanım ve toplam miktar açısından çok sayıda bileşiğin test edilmesinde sınırlı bir kaynaktır. Primer kültürde kullanılan insan hücreleri kullanımı etik onay gerektirir. Ayrıca hücre kaynağına bağlı olarak primer hücrelerin *ex vivo* kullanımında davranış değiştirebileceğinin göz önünde bulundurulması gerekir (Numao, Etienne, Malojcic, Schmidt, ve Dumelin, 2022).

Primer hücreler farklılaşır ve istenilen bir terapötik proteini salgılatmak için gerekli yapılara sahiptir ve genetik manipülasyonlar yapılabilir. Genel olarak proliferatif değildirler ve genetik olarak stabildirler (Bochenek, Delcassian ve Anderson, 2020).

Primer hücreler, direkt dokudan elde edildiği ayrıca *in vivo* sisteme daha benzer olduğu için ilaç denemelerinin kullanımında uygundur. Primer hücrelerin bakımı pahalı, kısa ömre sahip ve de dokunun alındığı donörden donöre çeşitli fizyolojilere sahip olmaktadır. İzolasyonu zaman alıcı, yeniden üretilmesi zordur (Andrade, Albuquerque, ve Nascimento, 2016).

Birincil kültür, kültürün hücrelerin izolasyonundan sonraki ancak ilk alt kültürden önceki aşamasıdır. Dikkate alınması gereken dört aşama vardır: Örneğin alınması, dokunun izolasyonu, diseksiyon veya ayrıştırma, kültür kabına ekildikten sonra kültürü devam ettirme. İzolasyondan sonra, bir birincil hücre kültürü, hücrelerin uygun bir substrata yapışan doku fragmanlarından dışarı çıkmasına izin vererek veya bir hücre süspansiyonu üretmek için dokuyu mekanik veya enzimatik olarak ayırarak elde edilebilir, bunlardan bazıları nihayetinde substrata bağlanacaktır. Hematopoietik hücreler haricinde, çoğu normal dönüştürülmemiş hücrenin hayatta kalmak ve maksimum verimlilikle çoğalmak için düz bir yüzeye bağlanması

gerekli görünmektedir. Dönüştürülmüş hücreler diğer yandan, özellikle nakledilebilir hayvan tümörlerinden alınan hücreler, genellikle süspansiyon halinde çoğalabilir.

Doku ayrıştırması için en sık kullanılan enzimler, tripsin, kollajenaz, elastaz, pronaz, dispaz, DNaz ve hiyalüronidazın tek başına veya çeşitli kombinasyonlarda ham preparatlarıdır. Ham preparatlar genellikle saflaştırılmış enzim preparatlarından daha başarılıdır, çünkü ilki kirletici olarak diğer proteazları içerir, ancak ikincisi genellikle daha az toksiktir ve eylemlerinde daha spesifiktir. Tripsin ve pronaz en eksiksiz ayrıştırmayı verir, ancak hücrelere zarar verebilir. Öte yandan kollajenaz ve dispase eksik ayrışmaya neden olur, ancak daha az zararlıdır. Hiyalüronidaz, hücre içi matrisi sindirmek için kolajenaz ile birlikte kullanılabilir ve DNaz, parçalanmış hücrelerden salınan DNA'yı dağıtmak için kullanılır; DNA, proteolizi bozma ve yeniden toplanmayı destekleme eğilimindedir (Freshney, 2005).

1.1.1.8. Annulus Fibrozis/Nükleus Pulposus (AF/NP) hücreleri

Vücudun birincil desteği omurgadır. Kemik yapılarının birbirine bağlanmasında yardımcıdır. Omurga; bireysel kemik segmentleri (omur), bağlar ve disklerden oluşmaktadır. Genelde 33 omur, 7 servikal, 12 torasik, 5 lomber, 5 kaynaşmış sakral, 4 kaynakmış koksigealden meydana gelir. Omurların arasında intervertebral diskler bulunmaktadır (DeSai, Reddy, ve Agarwal, 2021).

Her diskte 3 ana bileşen vardır. Bu bileşenler içinde nükleus pulposus (NP), annulus fibrozis (AF) ve kıkırdaklı uç plaklar (CEP) vardır. Annulus fibrozis, nükleus pulposusu sarar ve kolajence zengin bir yapıya sahiptir. Kıkırdaklı uç plaka ile nükleus pulposus arasında az miktarda hiyalin kıkırdak bulunur. Bu plakalar mekanik bariyer görevindedir, intervertebral diske besin taşınmasını desteklemede katkı sağlarlar (Moon vd., 2013).

Nükleus pulposus intervertebral disk içinde jele benzer yapıdadır. Omurgaya destek, esneklik ve güç sağlar. Yüksek oranda (%66-86) su ve tip II kolajenden meydana gelir. Proteoglikana ek olarak kıkırdak benzeri bileşenlere sahiptir. Bu proteoglikanlar nükleus pulposusta jel benzeri kıvamı sağlar ve su tutmaya yardımcı olur (Waxenbaum, Reddy, ve Futterman, 2022).

1.1.1.9. Kondrosit hücreleri

Kondrositler aktin mikrofilament, tübilinden mikrotübül ve çeşitli alt birimlerden oluşan ara filamentleri içeren yoğun bir hücre iskeletine sahiptir. Aktin filamentler hücre şeklinin

belirlenmesinde filament polimerizasyonuna bağı olarak değişken hücre biçimini oluşturmada, kondrojenezi başlatma ve kondrojenik fenotipte devam ettirmede önemlidir. Mikrotübüller hücre bölünmesindeki etkilerinin yanında organel dağılımını düzenleme, kolajen ve proteoglikan sentezi ve salgı veziküllerinin taşınmasında işlev görür. Kondrositlerde kümelerden oluşabilen çeşitli ara filamentler bulunabilir. Bu ara filamentlerin içinde vimentin, sitokeratin ve glial fibril asidik proteinler mevcuttur. Bu mevcudiyet eklem kıkırdığı içinde farklı derinliklere gelebilir. Vimentin, artan mekanik yüklemeye birlikte bazı fibrokartilajların gelişiminde birikir. Hücre iskeletinde bulunan elemanlar ile ara filament, hücrelerin dışardan gelen reaksiyona verdiği etkileşim ve dış ortam değişkenleri algılandığında mekanik transduksiyon sistemi oluşturabilir (Benjamin, Archer, ve Ralphs, 1994).

Kondrositler embriyoda iskelet sisteminin gelişiminde şablon görevi görür. Yetişkinlerde dağılım çok daha kısıtlı ve kalıcıdır, mekanik destek, büyüme, hareket için olmazsa olmazdır. Kıkırdak doku kan damarı içermeyen avasküler bir dokudur ve kondrosit hücreleri hücre dışı matris içinde izoledir. Sonuçta besin atık değişimi difüzyonla gerçekleşir ve normal/patolojik şartlar altında hücre düşük oksijenli bir ortamda var oluş bakımından benzersizdir. Kısmi olarak bu özellikler sonucunda özellikle eklem kıkırdığı klinik problem olan artrit gibi dejeneratif şartlar altında düşük bir onarım potansiyeline sahiptir (Archer ve Francis-West, 2003).

Kondrositlerin temel morfolojik özellikleri içinde eklemlerin, eklem üzerinde düzleşebilecekleri ya da diskoid olabilecekleri doku sınırları haricinde normal yuvarlak veya poligonal olmalarıdır. Kondrositler; kollajen, glikoprotein, proteoglikan ve hyaluronan bulunduran büyük matris hacmini sentezleme ve dönüştürme zorunda olan metabolik şekilde aktif hücrenin klasik özelliklerini gösterir (Stockwell, 1979).

1.2. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Kenelerin ısırıkları ağrısız, kaşıntısızdır bu nedenle fark edilmeleri zordur bunu tükürükleri sayesinde sağlarlar. Bilim adamları çeşitli kene türlerinin tükürüklerinde 3.500'den fazla protein kataloglamışlardır. Kenelerin böyle bir tükürüğe sahip olmasının nedeni diğer kan emicilerin aksine tek bir konaktan besleniyor oluşlarıdır. Çoğu kene türü yaşam döngüleri boyunca yalnızca bir kez beslenmektedir ve bu yüzden çok miktarda kan almaları gerekmektedir.

Keneler beslenmeye başladıklarında doğrudan kan damarlarından kan emmek yerine tükürüğüyle konakçıda dokunun bir kısmını yok eden enzimler salgılayıp bir yaralanma bölgesi sağlarlar ve o bölgeden kan emerler. Bu aşamayı kanın pıhtılaşmasını engelleyici proteinler salgılayarak devam ettirirler.

Ayrıca, kene bir konağın bağışıklık sisteminden kaçmak zorundadır. İnsanlar da dahil olmak üzere memeliler, birden fazla savunma hattına sahip karmaşık bağışıklık sistemlerine sahiptir ve kene tükürüğü hemen hemen hepsini etkisiz hale getirebilir. Keneler, histamine bağlanan ve histamini nötralize eden moleküller salgılar. Histamin en çok kaşıntı ve kızarıklığa neden olmasıyla bilinir, ancak aynı zamanda bağışıklık hücrelerinin bir yaralanma bölgesine ulaşmasına izin vermek için kan damarlarını açmada önemli bir rol oynar. Kene tükürüğü bunu engeller, bu nedenle kene ısırıkları kaşınmaz ve bağışıklık hücreleri ısırığa ulaşamaz. Kene tükürüğü, bir konakçıda ağrıya neden olan moleküler sinyalleri de bozar (Zhang, 2019).

Farklı kene türlerinden elde edilen tükürük salgısının hücre kültürlerinde değerlendirildiği birçok çalışma literatürde bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçları kene tükürüğünün antijen sunan hücreler (APC) olarak hizmet eden dendritik hücrelerde fagositozun inhibisyonu ve inflamatuvar sinyallerin baskılanmasını sağladığı ve antijen sunumuna müdahale edebildiğini göstermiştir (Scholl vd., 2016).

Başka çalışmalarda tükürük salgısının inflamatuvar mediatörlerin salgılanmasını sağlayabildiği belirtilmiştir. Ayrıca *Dermacentor variabilis*'ten SGE'nin fibroblastların yaralanmayı onarma yeteneğini baskıladığını gösterir (Madison-Antenucci, Kramer, Gebhardt ve Kauffman, 2020). Ek deneyler, SGE ve tükürüğün fibroblast göçünü engelleyebildiğini ve ERK aktivitesini azaltabildiğini göstermektedir. Bu nedenler ile tükürük, temel pro-inflamatuvar yolları inhibe edebilse de, evrensel bir inflamasyon inhibitörü olmadığı ve bu bağlamda tükürüğün etkilerinin, konukça hücrelerle etkileşimin uzunluğuna ve ilgili konukçu hücrenin tipine büyük ölçüde bağlı olduğu bildirilmektedir (Scholl vd., 2016).

Kene tükürüğünün en çok çalışılan bileşenlerinden biri Salp15'tir. Araştırmalar, bu proteinin T lenfositlerin yüzeyindeki CD4 moleküllerine spesifik olarak bağlandığını, TCR aracılı sinyal iletimine müdahale ettiğini, CD4+ T hücresi aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe ettiğini ve interleukin 2'nin (IL-2) salgılanmasını engellediğini göstermiştir. Salp15 ayrıca düzenleyici T hücrelerinde CD73 ekspresyonunu yukarı regüle etmek için dendritik hücreye

özgü hücreler arası yapışma molekülü-3'ü yakalayan integrin olmayan (DC-SIGN) spesifik olarak bağlanır.

Kan emilimi sırasında konak savunmasından kaçınmak için, *Ixodes* keneler tükürüklerinde immünomodülatör moleküller, yara iyileştirme inhibitörleri, analjezik faktörler, vazokonstriksiyon araçları, anti-hemostatik ve anti-inflamatuar faktörler dahil olmak üzere bir biyoaktif faktör kokteyli salgılar. Toplu olarak, bu bulgular, bu tükürük proteininlerini bir dizi terapötik uygulama için potansiyel bir aday haline getirir (Wen vd., 2020).

Primer hücreler, köken aldıkları dokuyu en yakından temsil edebilen hücre kültürleridir. Doğrudan dokudan alınır ve optimize edilmiş kültür koşulları altında çoğaltılırlar. Dokudan türetildikleri ve değiştirilmedikleri için, *in vivo* ile daha benzerdirler, normal fizyolojiyi ifade eden heterojen bir hücre popülasyonu olarak hücrelerin normal fizyolojisi ve biyokimyasını (örneğin metabolik çalışmalar, yaşlanma, sinyalleme çalışmaları), ilaçların ve toksik bileşiklerin hücreler üzerindeki etkilerini incelemek için mükemmel model sistemler sağlarlar (Anonim, 2021a). Planlanan bu tez çalışmasında *Hyalomma aegyptium* türü kenelerden elde edilen tükürük salgısı kıkırdak ve/veya intervertebral disk dokusu hücrelerine uygulanacaktır. Vücuda oral ya da parenteral yoldan herhangi bir şekilde uygulanan, ilaçların birçoğunun, sinoviyal sıvı kompartmanında biriktiği bilinen bir gerçektir (Guzelant vd., 2017). İlaçlar, etken maddeler ve/veya besinler, önemli miktarlarda, önce hyaluron veya sinovyal dokulara, oradan da vücut sıvılarına difüze olmaktadır. Daha sonra, kıkırdak dokusunda yer alan hyalin membrandaki porlardan geçerek, hücrelere ulaşmaktadır (Urits vd., 2019). İntervertebral disk (İVD)'ler, hareketlere izin veren spinal kompresyona direnen fibrokartilaj pedlerdir. Bu diskler, anulus fibrozusun (AF) kollajen tip I lamelleri, nükleus pulpozus (NP), düzensiz ince kollajen tip II ve elastin lifleri tarafından bir arada tutulan proteoglikan ve hidrojel yapısından oluşur. Anulustaki hücreler, fibroblastlar gibi kollajen liflerine paralel olarak yerleşmiş durumdadır. Diskin ana proteoglikanı, yüksek anyonik glikozaminoglikan içeriği (yani kondroitin sülfat ve keratan sülfat) nedeniyle, fiziksel sıkıştırmaya direnci sağlayan agrekandır. (Urits vd., 2019, Dowdell vd., 2017).

Eski Çin kaynaklarında böbrekte yang eksikliğinde kaplumbağa kabuğu tozu ile hastalıkta kullanılan bitkisel ilacın karışımının yalnız bitkisel ilaca kıyasla daha etkili olduğu yazılmıştır. Eski Mısır tıbbi bilgilerinde is katarak tedavisinde tosbağa beyniyle balın karışımı kullanılmıştır. Osmanlı'daysa tıpta kaplumbağa ürünlerinin kullanıldığı bilinmektedir. Hacı Paşa tarafında baş ağrısı, epilepsi, hafif felç durumlarında ilaç uygulaması kaplumbağa kanının

kullanımından bahsetmiştir (Sevimli ve Kadioğlu, 2002). Yörükler arasında kullanılan veremli hastalarda kara kaplumbağası sırtının çiviyle delinip sızan kanı hastaya içirildiği, hemoroid için ise devetabanı otu ile kaplumbağa kanı ve ardıç püsesi karıştırılıp hap yapılarak yutturulduğu bilinmektedir (Ak, 2017).

Bu bilgiler ışığında hücre kültürüne kaplumbağa kanı uygulanması planlanmış ancak olayın aslında kaplumbağa kanı değil kandaki proteinlerin işlevlerinin bakılması gerektiğinden ve proteini en iyi süzen hayvanın kene olduğu artı olarak kene tükürüğünün de proliferasyon üzerindeki etkilerinin literatür sonuçlarında pozitif olduğu ve bu doğrultuda özellikle kaplumbağaya tutunan bir kene türü olan *Hyalomma aegyptium* kenесinin tükürüğünün uygulanması amaçlandı. Vücudun en önemli desteği olan omurga içinde esneklik ve güç sağlayan *Annulus fibrosis nükleus pulposus* hücreleri ile iskelet gelişiminde şablon olan kıkırdak hücreleri, *Hyalomma aegyptium* türünün tükürük bezi içeren besiyerinin kullanıldığı bir kültür yapılması planlandı.

Çalışmalar kene tükürük bezi protein içeriğinin kene kaynağına bağlı olarak değiştiğini, dolaylı olarak çevresel koşulların ve muhtemelen konakçı beslenme tercihlerinin tükürük bezi içeriği ve immünojenisite üzerinde bir etkisi olabileceğini göstermektedir (Maldonado-Ruiz, vd., 2019). Bu nedenle çalışmamızda daha önce çalışılmamış olan ve doğal alanlarda yaşayan kaplumbağalar üzerinden toplanan *Hyalomma aegyptium* türü keneler kullanıldı. Ayrıca model doku olarak literatürde ilk defa bu çalışmada primer kıkırdak hücreleri ve IVD'ye ait AF/NP hücrelerinde tükürük salgısının hücre canlılığı ve çoğalması ile ekstraselüler matriks (ESM) yapısına toksik etki gösterip göstermediğinin araştırılması amaçlandı.

2. MATERYAL METOT

2.1. Kullanılan cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (Class II), Nüve
- Buzdolabı, Profilo
- CO2 etüv, Thermo
- Çalkalayıcı su banyosu, Nüve
- Derin dondurucu -20 °C, Vestel
- Distile su cihazı, GFL
- İnvert mikroskop, Olympus
- Mini mikrosantrifüj, Cleaver
- Neubauer lamı, Marienfeld
- Otoklav, Hirayama
- Otomatik pipet seti, Axygen axypet
- Soğutmalı santrifüj, Nüve
- Pens, Artifol-Ent (1.0 mm)
- Makas, Artifol-Ent (düz)
- Sterio mikroskop, Labomed (CZM6)
- 1,5 ml Mikrotüp, Axygen (MCT150C)
- 15 ml tüp, Axygen (SCT15ML500)
- 50 ml tüp, Axygen (SCT50ML500)
- -80 °C Dolap, Thermo (TS586)
- Homojenizatör, Isolab (ultratorrax)
- Spektrometre, Mettler (UV7)
- Enjektör filtresi (0.22 µm), Corning (431229)
- Cryo Tüp (2 ml), Corning (CLS430659)
- Plate okuyucu, BioTek (Synergy H1)
- 96 kuyucuklu petri kabı, Corning (4580)
- 6 kuyucuklu petri kabı, Corning
- Güç kaynağı, Cleaver Scientific
- Mini jel tankı, Invitrogen
- Vorteks, WiseMix
- Kültürde kullanılan vakum cihazı, Rocker 300

2.2. Kullanılan kimyasallar

- Amfoterisin B, Multicell
- Etanol, Sigma
- Fetal Sığır Serum (FBS), Multicell
- L-glutamin, Multicell
- Penisilin/Streptomisin, Sigma
- DMEM, Sigma
- Tripsin, Sigma
- Tripan mavisi, Fluka
- Fosfatlı tuz tamponu (Phosphate Buffered Saline – PBS), Gibco
- AO (Acridine Orange) / PI (Propidium Iodie) Boya, Sigma

- Glisin, Sigma
- SDS, Boehringer Mannheim
- Akrilamid, Sigma
- N’N’ bis, Sigma
- B-Merkaptoetanol, Sigma
- Gliserol, Sigma
- APS, Sigma
- Tris baz, Sigma
- BSA, Sigma

2.3. Kullanılan kitler

Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit, Thermo Scientific

2.4. Besiyerinin hazırlanması

Dulbecco’s Modified Eagle’s (DMEM) düşük glikozlu olduğu için 3,5 gram ekstra glikoz eklendi (DMEM’de 1 gram glikoz bulunmakta). DMEM toz halde bulunur ve içerisinde gerekli bütün iyon, aminoasit, yağ bulunmaktadır. Besiyerine 3,6 gram sodyum bikarbonat eklendi. 2 ml Amfetorisin B, 10 ml penisilin streptomisin ve 10 ml L-glutamin eklenerek karıştırıldı. Monodistile su ile 900 L’ye tamamlandı ve 100 ml fetal sıgır serumu eklendi. 0,22 mikron gözenekli filtreden geçirilerek steril edildi ve kullanılacağı zamana kadar +4C°’ye kaldırıldı.

2.5. Kullanılan solüsyonlar

%70 Etanol: 70 ml saf etanol üzerine 30 ml su eklendi.

2.6. Yöntemler

2.6.1. Çalışmada kullanılan kenelerin toplanması ve diseksiyonu

Kısmi olarak veya büyük çoğunlukta doymuş, beslenme aşamasında yarıya geldiği anlaşılan dişi keneler kaplumbağalardan penset ile toplandı. Tam doyan kenelerde yapılan diseksiyonda tükürük bezlerinde franjil ya da dejenere oldukları görüldüğü için beslenme aşamasını tamamlayıp konaktan düşmeye hazırlanan ve beslenme aşamasını tamamlayan dişi keneler dahil edilmedi. Konaktan toplanan keneler ıslak kağıt havluya sarılı kapağı hava geçirgenli olan tüpte 18-22 °C, yüksek nemli ortamda laboratuvara getirildi. Yüksek sıcaklığa maruz kalmamaları için önlemler alındı. Toplanan kenelerin tutulduğu kap şekil 2.1.’de mevcuttur.

Keneler tek tek tartılıp 10-20'li gruplar halinde 50 ml'lik falkon tüpe alınıp oda sıcaklığına sahip distile suda çalkalanarak yıkandılar.

Ardından falkon tüp içinde %70 alkolde 5 saniye çalkalanıp yıkandı sonra oda sıcaklığındaki distile su işe çalkalanarak yıkandılar.

Yıkanmış olan keneler +4°C PBS içinde stereo mikroskop altında disekte edilerek tükürük bezleri alındı. Tükürük bezlerinin alınması sırasında keneler arka kısımdan hafifçe bastırılarak ve arka uç kısımlardan integüment mikro cerrahi makas ile transversal şekilde kesildi. Bu kesit uç kısımdan yapılarak yalnızca integümentin açılması istenmiş ve bağırsak ya da diğer organların kesilmemesine özen gösterildi. Ardından kenenin ön kısmına hafif basınçla bağırsakların arkaya doğru gelmesi ve kesilen kısımdan protruze olması sağlandı. Önden ağız organelinin hemen arkasından kesildi ve kesitin iki taraftan makas ile önden arkaya integüment kesildi. Sonucunda kenenin integümenti tam olarak ikiye ayrıldı. Kesme bittiğinde ön kısımdan üst parça penset, alt parça başka bir penset yardımıyla tutulup üst kısım yine penset ile geriye çekildi. İç organları görünen kenenin bağırsakları yavaşça çekilerek uzaklaştırıldı, tükürük bezleri traheal dallar ile toplu olarak +4 °C PBS'li ortama aktarıldı. Gruplara ayrılmış olan keneler ve diseksiyon esnasın kullanılmış olan malzemeler şekil 2.2.'de verilmiştir. Kene diseksiyonuna ait görsel şekil 2.3.'te verilmiştir.

Diseksiyon esnasında çıkarılan tükürük bezleri +4 °C PBS içinde toplandı ve diğer doku parçalarından arındırıldı. Kene tükürük bezleri ve bağırsakları şekil 2.4.'te gösterilmiştir.

Arınan tükürük bezleri 1 ml +4 °C PBS bulunan kryotüplere alındı ve ardından tüpteki PBS mikropipet ile uzaklaştırıldı. Bezlerin üzeri kapatılacak kadar PBS kalması sağlandı. Böylece yoğunluk istenilen dilüsyon ayarlanmasına imkan sağlayacak biçimde ayarlandı.

Diseksiyon başlangıcından itibaren bezlerin dondurucuya kaldırılmasına kadar geçen sürede keneler ve tükürük bezlerinin +4°C'nin üzerine çıkmamasına dikkat edildi. Her 10-20'li kene gruplarının tükürük bezleri için ayrı kriyotüp kullanıldı. Gerekli etiketler eklenen tüpler -20° C'ye alındı.



Şekil 2.1. Toplanan kenelerin tutulduğu kaplar



Şekil 2.2. Grup olarak ayrılan keneler ve diseksiyon sırasında kullanılan malzemeler



Şekil 2.3. Kene diseksiyonu



Şekil 2.4. Tükürük bezleri, bağırsaklar

2.6.2. Kene tükürük lizatı hazırlanması

Kriyotüp içinde -80°C muhafaza edilen tükürük bezleri homojenizatörle mekanik olarak parçalandı. Homojenizatör ağzı önce etil alkolle sterilize edilmiş ardından distile su ile yıkanmış ve tüplerde bulunan tükürük bezleri homojenizatör yardımıyla parçalanmıştır. Parçalanan tükürük bezleri 12.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendikten sonra artıkları içeren pellet atılmış, süpernatant alınmıştır.

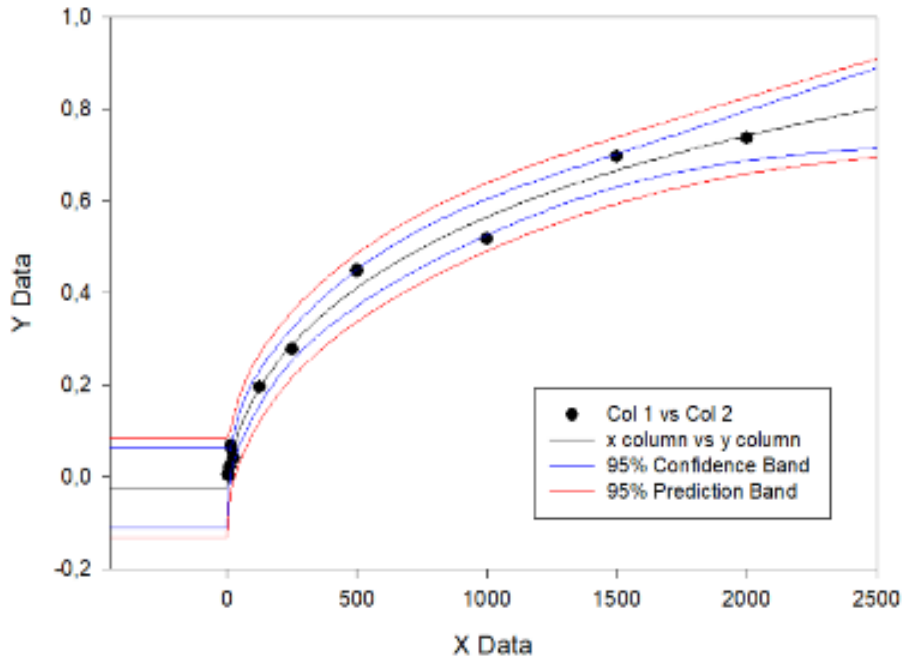
2.6.3. Tükürük bezi ekstraktındaki protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Tükürük bezi ekstraktındaki protein konsantrasyonu belirlenmesi için ışık absorpsiyonu yöntemine dayanan bradfort yöntemi kullanılmıştır. Molekülün hangi dalga boyunda ışığı absorbladığına bakılarak miktar tayini yapılır. Boya bağlama temelli bu Coomassie Brilliant

Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Bu boya, (+) yüklü bir proteine bağlandığında ise renk maviye dönüşür ve 595 nm absorbans verir. Coomassie boya bazlı (Bradford) protein tahlillerinde rengin gelişimi, proteinde belirli temel amino asitlerin varlığıyla ilişkilendirilmiştir. Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler de boyanın protein tarafından bağlanmasına katılır. Her bir protein molekülüne bağlı Coomassie boya ligandlarının sayısı, protein üzerinde bulunan pozitif yüklerin sayısı ile yaklaşık olarak orantılıdır.

2.6.4. Standart grafik hazırlanışı

- Stok BSA 10 kez seri sulandırıldı. Bunun için stok BSA çözeltisinden 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 μ l alınarak 8 adet ependorf tüpe kondu. Tüm bu işlemler buz içinde yapıldı.
- Her tüpe protein miktar tayin kitinden 1 ml eklenip, 5 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- Süre sonunda 595 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri spektrofotometrede okundu.
- Standart grafik elde edilen bu değerlere göre X ekseninde protein miktar= μ g/ ml ve Y ekseninde absorbans değerleri olacak şekilde sigmaplot yazılımı kullanılarak hazırlandı. Standart grafiğe ait görsel şekil 2.5.'te verilmiştir.



Şekil 2.5. Sigma plot programı kullanılarak elde edilen standart grafik

2.6.5. Kene lizatlarında protein miktar tayini

- Kene lizatlarından 1 µl ependorf tüpe konuldu
- Üzerlerine 1 ml kit konularak 5 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.
- Örnek içerisindeki protein miktarı hesaplandı. Standart grafikte örneğin verdiği absorbans değerine karşılık gelen µg/ml cinsinden BSA miktarı örneğin içerdiği protein miktarını vermektedir. Hesaplamaların hepsi sigmaplot yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

2.6.7. Protein profilinin belirlenmesi

Protein profili belirlenmesinde 2-D jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır.

2.6.7.1. Kullanılan solüsyonlar

Ayrıştırma jeli tamponu: Ayrıştırma jelinin konsantrasyonu 1.5 M ölçüde 181,65 g Tris baz (Sigma) tartıldıktan sonra 800 ml monodistile su içinde çözdürüldü. 1 M'lık asit kullanımıyla pH 8.8'e ayarlanıp hacim monodistile suyla 1 L'ye tamamlanıp, +4°C 'de buzdolabında korundu.

Yükleme jeli tamponu: Konsantrasyonu 0,5 M olacak ölçüde 60,55 Tris baz tartıldıktan sonra 800ml monodistile su içerisinde çözdürüldü. 1 M'lık asitle pH 6.8'e ayarlandı hacim monodistile su ile 1 litreye tamamlanıp +4C'de korundu.

10X Elektroforez Tamponu: 15 g Tris baz, 94 g Glisin (sigma) tartıldıktan sonra 500 ml monodistile suyla çözdürülüp 50 ml %10'luk SDS ile son hacim 1 L olacak ölçüde monodistile su eklendi.

2X Yükleme: 3ml %10 SDS, 1 ml Gliserol (Sigma), 0,5 mL B- Mercaptoetanol ve 20 uL Bromfenol mavisi 15 mililitrelik tüpe alındı. Enjektörle 0,22 µm'lik porlu filtreden geçirilip partiküller giderildi 1 ml'lik ependorflara alınıp 20 °C'de korundu.

Akrilamid: 29 g akrilamid 1g N'N' bis 100 ml mono distile suyla çözülüp hazırlandı alüminyum folyayla sarılıp ışıktan korundu 4 °C'de muhafaza edildi.

%10 SDS: 10 g SDS tartılıp monodistile su ile çözülüp pH 7,2'ye getirildi. Oda sıcaklığında korundu.

%10 APS: 10 g APS 100 ml monodistile suda çözdürülüp 4 °C'de korundu.

2.6.7.2. Jel hazırlığı

%7'lik Ayırıştırma Jeli: %9 ddH₂O, 3,73 ml %30 Akrilamid, 4 mL 1,5 M Tris (pH 8,8), 160 µL %10 SDS, 160 µL %10 APS ve 16 µL TEMED (N'N'N'N'-Tetrametiletildiamine) tüp içerisinde karıştırıldı. Jelin donmasını hızlandırdığı için TEMED en son eklenen malzemedir.

%6'lık Yükleme Jeli: 5,3 ddH₂O, 2 mL %30 Akrilamid, 2,5 mL Tris (pH 6,8), 100 µL %10 SDS, 100 µL %10 APS ve 10 µL TEMED tüp içinde karıştırıldı.

Örneklerin hazırlanması: -20 °C'de korunan örnekler çözöldükten sonra vortekslendi. 8 µL örnek, 4 µL boya, 28 µL NETN eklendi tüp kapağı kapatılıp 10 dakika boyunca protein yapısını bozmak, denatüre etmek amacıyla kaynatıldı.

Mini jel tankın platform camları cihaz içinde sıkıştırıldıktan sonra önce ayırıştırma jeli 45 dakika donması beklendikten sonra yükleme jeli dököldü ve yükleme jeli üzerine örneklerin yüklenebileceği kuyucuklar açmak için tarak konulup jelin donması beklendi. Platform tanka yerleştirildikten sonra 1x elektroforez tamponu yükleme jeli kuyucuklarını geçene kadar tanka eklendi. Protein konsantrasyonu hesaplanan örnekler kuyucuklara mikropipet ile yüklendi. Güç kaynağında akım 80 volt, amper 45 mA'ya ayarlanıp yürütöldü.

2.6.8. Hücre költürü uygulamaları

Annulus fibrozis/nökleus pulposus ve kıkırdak hücreleri kullanıldı. -80 °C'de saklanan kriyotüpte bulunan hücreler sıcak su banyosunda 37 °C'de çözöldü. Çözölen hücreler kriyotüpten 15'lik falcona alınıp üzerine 5 ml besiyeri eklendi. 1200 rpm'de 1 dk santriföjlendi. Hücreler; FBS, penisilin streptomisin ve L-glutamin eklenmiş DMEM ile T-25 költür kapları içine alınıp etüve koyulup çoğalması beklendi çoğalan hücreler pasajlandı. Pasajlanma esnasında besiyeri vakum ile pastör pipeti kullanılarak çekildi ardından hücrelerin eski besiyerinden temizlenmesi amacıyla 1 ml PBS költür kabı içine aktarılıp PBS bütün hücrelere temas edecek şekilde költür kabı yüzeyinde gezdirildi. PBS çekilip yüzeye yapışan hücrelerin kaldırılması amacıyla 2 ml tripsin eklendi, hücreler yüzeyden kalkınca pipet yardımıyla santriföj tüpüne alındı. 3 ml DMEM eklenip 1300 rpm'de 3 dk santriföjlendi. Süpernatant atılıp pellet alındı, 5ml DMEM ile yeni bir költür kabı içine alınıp etüve koyuldu.

2.6.8.1. Hücre sayımı

Kültüre edilen AF/NP ve kıkırdak hücrelerinin 96 well plate ekilmesi ve her bir kuyucuk için ne kadar hücre olacağının belirlenmesi için kültür kabındaki hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra 15 ml'lik tüplere alınıp 1100 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Pellete 2 ml besiyeri eklenip, steril eppendorfa 100 µl alındı. Üzerine 100 µl tripan mavisi eklendi ve karışımdan 10 µl neubauer lama alınıp, mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Ekime 2×10^6 kadar hücre ile başlandı.

2.6.8.2. Kene tükürüğünün kültürlerle uygulanması

Pasajlanıp santrifüjlenen hücrelerden 24 well platelere hücre ekimi gerçekleştirildi. Her bir kuyucuk için 24.000 hücre ekildi. 1,5 ul besiyeri eklendi. Çoğalmaları için inkübasyona bırakıldı. Çoğalan hücrelerin besiyerleri alınıp 1, 10, 20, 40 ve 60 µg şeklinde belirlenen dozlar için ayrı ayrı uygulama yapıldı.

Pasajlanıp santrifüjlenen hücrelerden 96 well platelere her bir kuyucuk için 9000 hücre artı 150 µL besiyeri olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Çoğalmaları için inkübasyona bırakıldı. AO/PI boyama ve MTT analizi için 96 well platelere ekilen hücrelere belirlenen 20, 40, 60 µg konstrasyonlarında kene tükürüğü eklendi, bir grup da kontrol grubu olarak ayrıldı.

2.6.8.3. MTT [3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] hücre canlılık analizi

MTT hücre canlılığı ölçümü için kullanılan kolorimetrik bir testtir. Mitokondriyal enzim aktivitesi ölçümünü sağlar. MTT tahlili, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücresel metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır. Bu kolorimetrik deney, sarı bir tetrazolyum tuzunun (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür veya MTT) metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanır. Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen NAD(P)H'ye bağımlı oksidoredüktaz enzimleri içerir. Çözünmeyen formazan kristalleri, bir çözündürme çözeltisi kullanılarak çözülür ve elde edilen renkli çözelti, çok kuyulu bir spektrofotometre kullanılarak 500-600 nanometrede absorbans ölçülerek nicelendirilir. Çözelti ne kadar koyu olursa, canlı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı o kadar fazla olur.

2.6.8.3.1. MTT solüsyonu hazırlama

Kullanılan İnvitrogen Vybrant kiti içerisinde bulunan MTT 3-bromid kitinden 5mg/1 ml steril PBS içerisinde çözülürülerek hazırlanır.

T25 flasklarda çoğaltılan AF-NP ve kıkırdak hücreleri konfluent hale geldikten sonra hücreler MTT analizlerini gerçekleştirmek üzere 8000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyulu kültür kaplarına ekildi. Ekilen hücreler konfluent seviyeye geldiklerinde üzerlerine 20, 40, 60 µg/ml şeklinde kene tükürük lizatı eklendi. Uygulamalar üç tekrarlı şekilde gerçekleştirildi. 24 saat sonunda lizatlı besiyeri pipetaj ile uzaklaştırıldı. MTT solüsyonlu kültür kabı etüv içinde 3 saat 37 °C’de bekletildi. Süre bitiminde tetrazolyum tuzlarının çözünmesi ve reaksiyonun durması amacıyla kuyucuklardaki MTT solüsyonundan 25 µl alınıp 50 µl DMSO eklendi. ELISA plate okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi.

Uygulama yapılmayan kontrol grubundan elde edilen optik densite (OD) değeri %100 canlılık kabul edilerek tüm uygulama gruplarında;

% Canlılık=OD test grubuX100/OD kontrol grubu formülüne göre % canlılık hesaplanmıştır.

2.6.8.4. AO (Acridine Orange) / PI (Propidium Iodie) boyama

Acridine orange canlı hücre çekirdeği için yeşil, cansız hücre çekirdeği için kırmızı renk veren ve bir tür canlılığı gösteren boyadır. Cansız hücre duvarından geçip nükleik asitleri boyayan PI, hücrelerin floresan ışık saçan kırmızı görüntüye sahip olmalarını sağlar bu şekilde hücre canlılığı belirlenir. Bu özellikleri sayesinde canlı ve ölü hücrelerin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Floresan mikroskop altında yeşil ve kırmızı renkli hücreler görüntülenir.

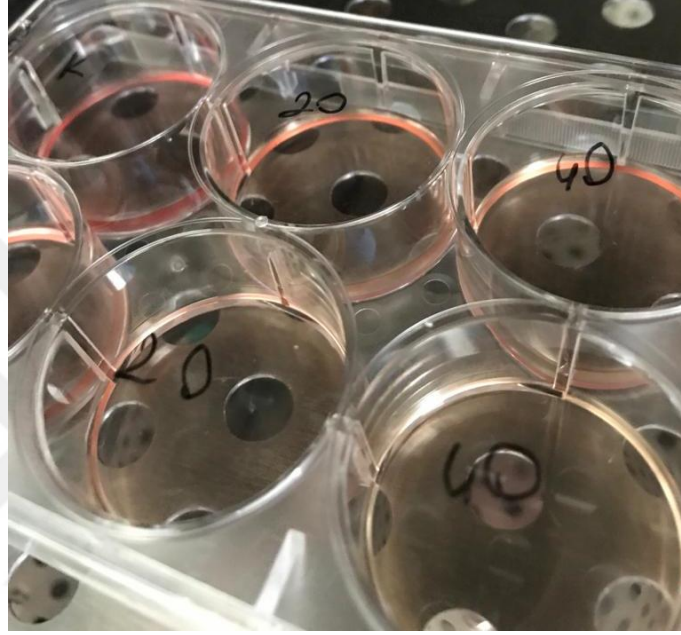
2.6.8.4.1. AO/PI solüsyonu hazırlama

10 gr sodyum-etilendiamintetraasetik asit, 4mg PI ve 50 ml FBS ile hazırlanan AO/PI boyası, 4 mg AO (2 ml %99 ETOH içinde çözülmüş) iyice karıştırılmış ve 200 ml son hacime ulaşmak için steril damıtılmış su ilave edildi.

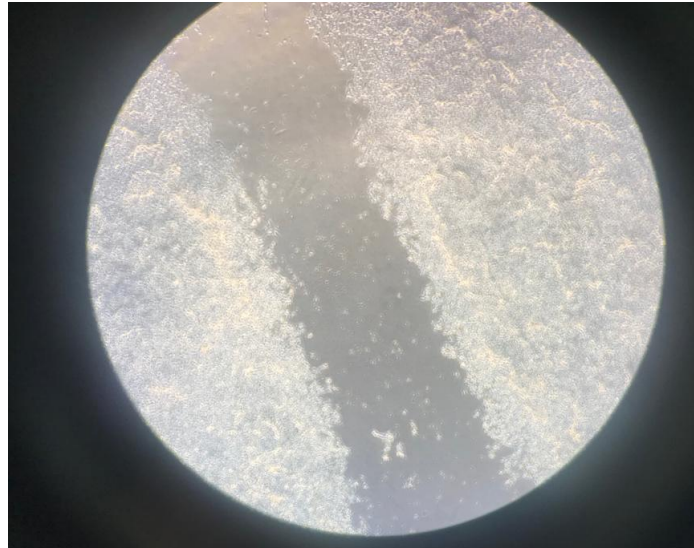
Hazırlanan AO/PI Solüsyonundan 96 welle ekilmiş hücrelere 20 µl boya damlatıldı, karanlıkta 10 dakika inkübe edildikten sonra floresan mikroskopta görüntülendi.

2.6.8.5. Yara iyileşmesi

AF/NP ve kıkırdak hücreleri iki ayrı 6 well plate'e ekildi. Her bir kuyu için yaklaşık olarak 40000 hücre ekildi, 1,5 ml besiyeri eklendi. Etüvde çoğalması beklendi besiyeri konstrasyonu ayarlanmış kene tükürüğü içeren besiyeriyle değiştirildi. Her platede, 1000 μ L'lik pipet ucu yardımıyla yarıklar açıldı ve yarıkların kapanma süresi gözlemlendi. Yara iyileşmelerine ait görseller şekil 2.6. ve 2.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Biyogüvenlik kabininde yaraları açılmış 6 well plate içerisindeki hücreler



Şekil 2.7. Mikroskop altında açılan yara görüntüsü

3. BULGULAR

3.1. MTT hücre canlılık analizi

T25 hücre kültürü kaplarında çoğaltılan AF/NP ve kondrosit hücreleri konfluent olduktan sonra tripsin ile kaldırıldıktan sonra 96 well plate'e kuyucuk başına yaklaşık olarak 9000 hücre 150 µL ölçülerde ekim yapıldı. Ekim yapılan plate 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda belirlenen konsantrasyonlarda kene tükürüğü ile muamele edildi. Uygulamalar 3 tekrarlı şekilde yapıldı. Kene tükürüğüyle muamele 24 saat sürdü, 24 saatin sonunda kültürde kene tükürüğü içeren besiyeri vakumlu pipet ile çekildi ve MTT solüsyonu eklendi. 4 saat 37 °C'de bekletildi. Bu sürenin sonunda tetrazolyum tuzlarını çözmek ve reaksiyonu durdurmak amacıyla üzerlerine DMSO eklendi. ELİZA okuyucuyla 570 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi.

Uygulama gerçekleştirilmeyen kontrol gruplarından alınan optik densite (OD) %100 canlılık var olarak kabul edildi. % Canlılık = OD test grubu x 100 / OD kontrol grubu şeklinde % canlılık hesaplandı. Veriler çizelge 3.1 ve 3.2'de paylaşılmıştır.

Çizelge 3.1. AF/NP hücrelerinde MTT analiz sonuçları

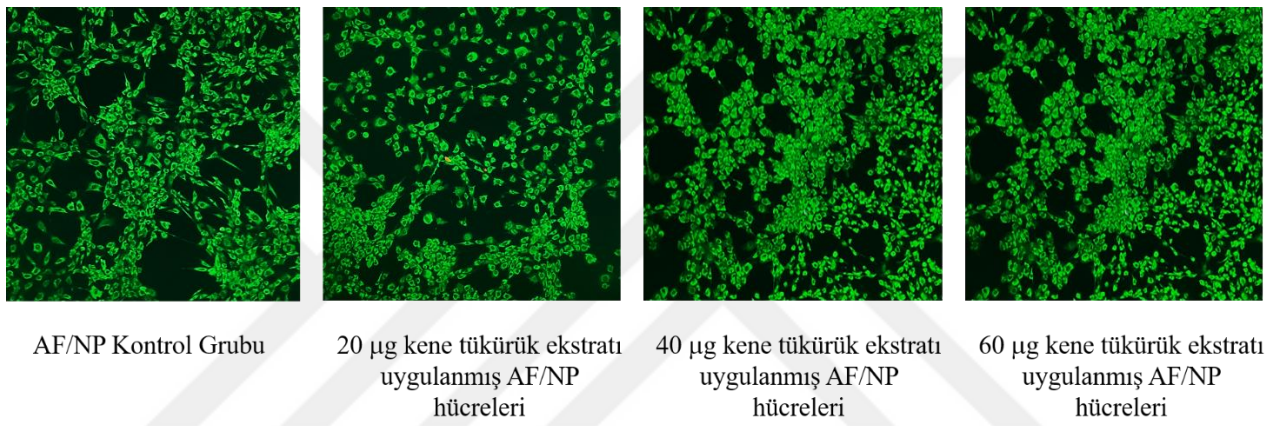
AF/NP	Ortalama OD	Düzeltilmiş OD	% Canlılık
Kontrol	0,546333	0,3453333	100
20 µg	0,469667	0,2686667	77,79997876
40 µg	0,554667	0,3536667	102,414116
60 µg	0,456	0,255	73,84241161
Blank	0,201333		

Çizelge 3.2. Kondrositlerde MTT analiz sonuçları

KONDROSİT	Ortalama OD	Düzeltilmiş OD	% Canlılık
Kontrol	0,391	0,199	100
20 µg	0,402	0,21	105,5276
40 µg	0,343	0,151	75,8794
60 µg	0,34	0,148	74,37186
Blank	0,192		

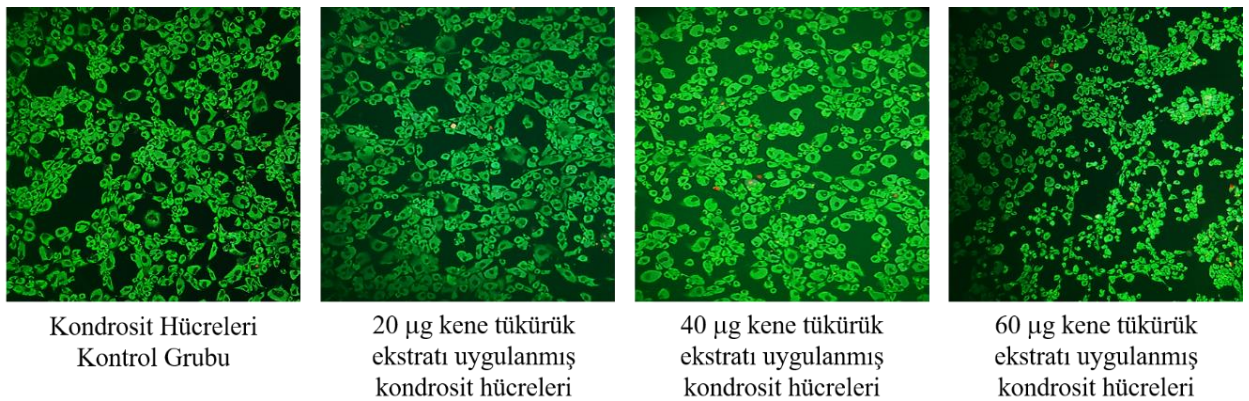
3.2. AO/PI boyama sonuçları

MTT analiz sonuçlarını teyit etmek ve hücre ölümleri apoptotik mi diye görmek amacıyla kene tükürüğü uygulanmış AF/NP ve kondrosit hücreleri için AO/PI boyama yapıldı. Uygulama dozunda yapılan değişiklikler içinde proliferasyonda kondrosit hücreleri için konsantrasyon 20’de %5 artış, AF/NP için konsantrasyon 40’ta %2 artış görüldü. Proliferasyonda kondrosit hücreleri için konsantrasyon 40’ta %25, 60’ta %26; AF/NP için konsantrasyon 20’de %23, 60’ta %27 oranında bir azalış görüldü. Floresan mikroskop kullanılarak elde edilen AF/NP hücrelerine ait görüntüler Şekil 3.1.’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda kene tükürüğü uygulanmış AF/NP hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri

Floresan mikroskop kullanılarak elde edilen Kondrosit hücrelerine ait görüntüler Şekil 3.2.’de verilmiştir.



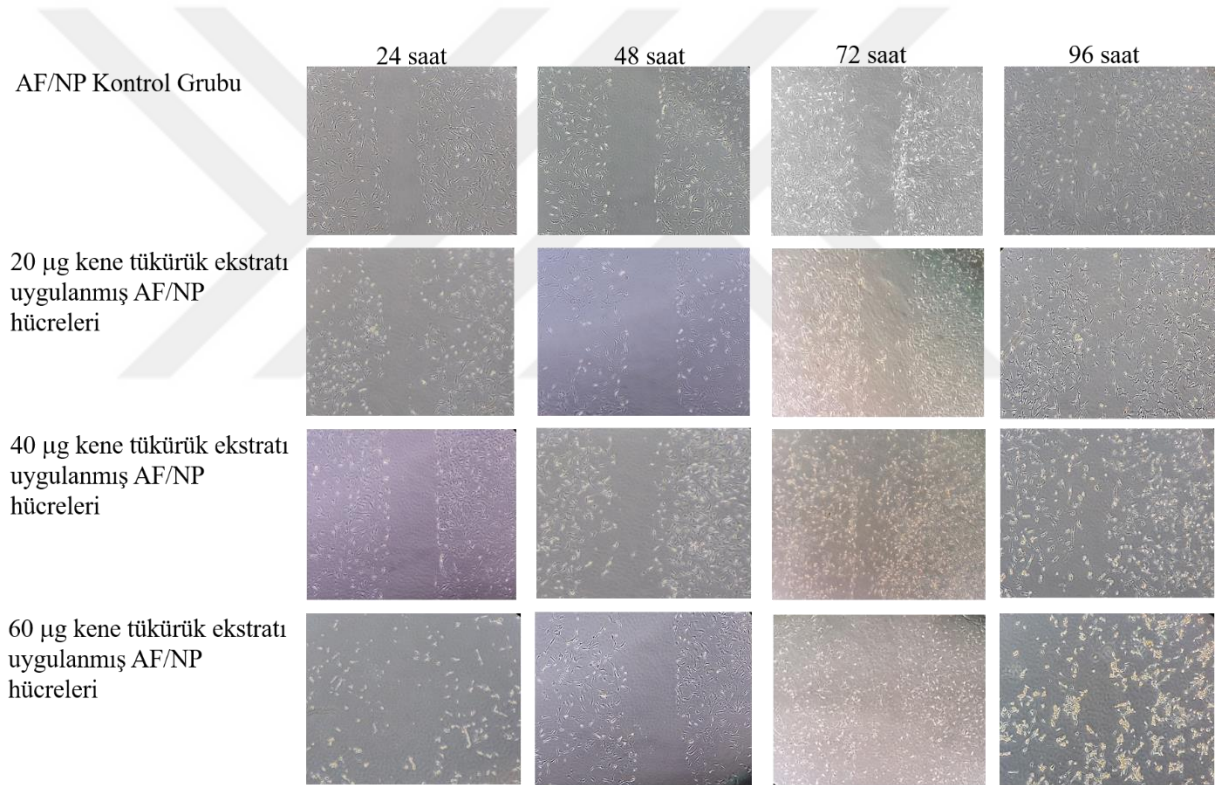
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda kene tükürüğü uygulanmış kondrosit hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri

3.3. Yara iyileşmeleri

6 well plate'in her gözüne 40000 hücre ekilmiş ve kene tükürüğü içeren 1,5 ml besiyeri koyuldu 1000 μ L'lik pipet ucu yardımıyla yarıklar açıldı ve bu yarıkların kapanma süresi 24 saat süreyle görüntülendi.

3.3.1. AF/NP hücreleri

Konsantrasyon 20 için kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik gözlenmedi, konsantrasyon 40 için yaranın hızlı bir şekilde kapandığı, konsantrasyon 60 içinse yarada olumsuz bir yönde değişiklik olduğu gözlemlendi. İnvirt mikroskopi kullanılarak elde edilen fotoğraflar Şekil 3.3.'de verilmiştir.



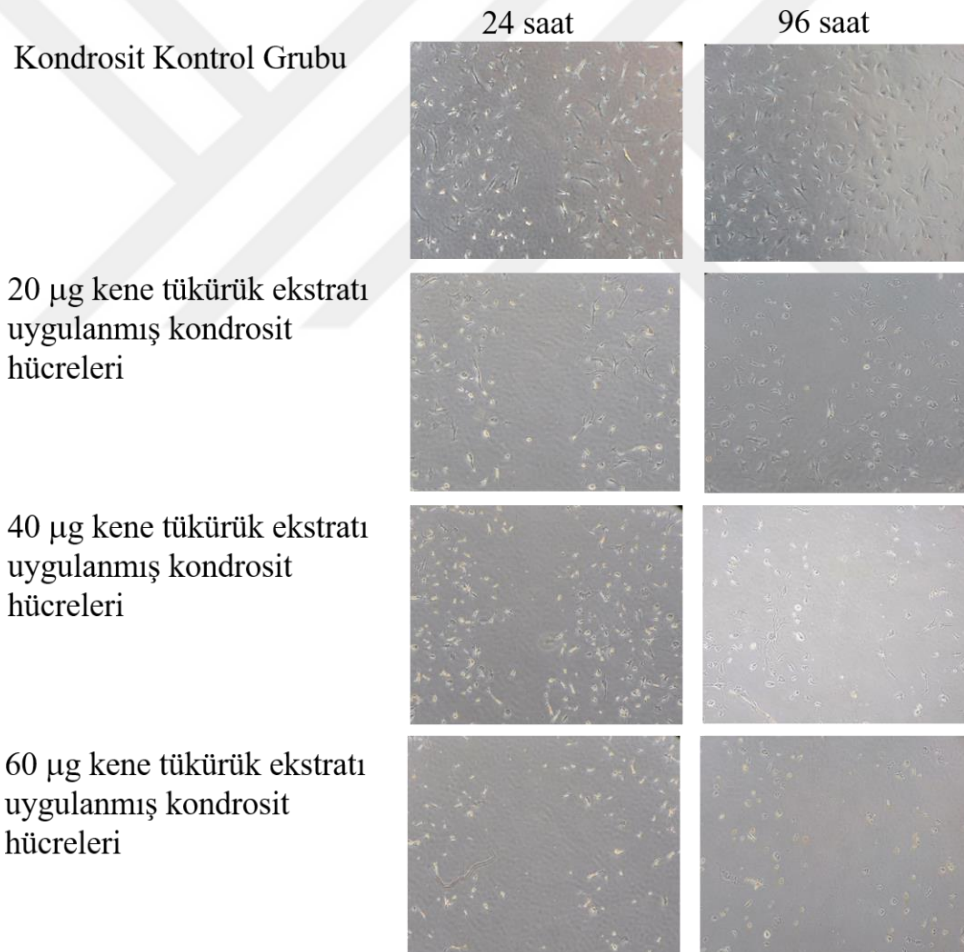
Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda kene tükürüğü uygulanmış AF/NP hücrelerinde yara iyileşmeleri

AF/NPC hücreleri için 96 kontrol grubunda yara iyileşmesinde kapanma gözlemlenirken, konsantrasyon 20'de ve 40'ta kontrol grubuna yakın bir kapanma görülürken, konsantrasyon 60'ta kapanma gözlemlenmemiştir.

3.3.2. Kondrosit hücreleri

24 saatte kondrosit hücreleri kontrol grubunda yara kapanması gözlemlenirken konsantrasyon 20’de kontrol grubuna göre daha az kapanma, konsantrasyon 40’ta kontrol grubuna göre daha çok kapanma gözlemlendi, konsantrasyon 60’ta yarada kapanma gözlemlenmedi.

96 saatte kondrosit hücreleri için kontrol grubunda tam bir kapanma gözlemlenirken konsantrasyon 20 ve 40 için kontrol grubuna yakın bir kapanma, konsantrasyon 60 için kapanma gözlemlenmemiştir. İnvert mikroskop kullanılarak elde edilen fotoğraflar Şekil 3.4.’de verilmiştir.



Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlarda kene tükürüğü uygulanmış kondrosit hücrelerinde yara iyileşmeleri

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bir çalışmada farklı kene türlerinden (*D. Marginatus*, *Hyalomma Marginatus*, *Rhipicephalus bursa*) tükürük bezi ekstrakte elde edilmiş ve farklı konstrasyona sahip fare blastosist embriyonik kök hücrelere uygulama yapılmış ve erken, geç evrelerde CTG testiyle proliferasyona bakılmıştır. *D. marginatus* için erken ve geç evrelerde fEKH'nin proliferasyonun negatif etkileşim gözlenmiş, orta evrelerde kontrol grubuyla hemen hemen benzer sonuçlar sergilenmiş farklı bir konstrasyonda ise orta evrede proliferasyon olumlu aynı konstrasyonun geç evresinde olumsuz etki gözlemlenmeye başlamıştır (Kocabay, 2018).

Hyalomma marginatum için uygulama yapıldığında kültürün bütün evrelerinde proliferasyon negatif etkilenmiştir. *D. marginatus*, *H. marginatum* türlerinin kullanıldığı kültürlerde yüksek konstrasyonda kene tükürük salgısının kullanılması kültürün orta evresinde maksimum pozitif etkiyi vermiştir. *Rhipicephalus bursa* için hücre kültürünün bütün evrelerinde proliferasyon negatif etkilenmiştir. *H. marginatum* ile *R. bursa* tükürüklerinin kullanıldığı kültürlerde düşük konsantrasyon ve erken evrelerde maksimum pozitif etki görülmüş. Sonuçlar doğrultusunda grupların ortak özellikleri genel olarak yüksek konsantrasyon uygulanan kültürlerde orta evrede proliferasyonun daha olumlu etkilendiği gözlemlenmiştir. En etkili proliferasyonu sağlayarak kontrol grubundaki proliferasyonu geçen tür *D. marginatus* grubu olmuş ve diğer iki tür için bu gözlem geçerli olmamıştır (Kocabay, 2018).

Yapılan farklı çalışmalarda farklı türden kenelere ait kene tükürüğünün yara onarımını artırdığını hücre proliferasyonunu desteklediği görülmüştür. Bu çalışmada *Hyalomma aegyptium* kenesinin tükürük bezinin AF/NP ve kıkırdak hücrelerinde hücre canlılığı, hücre proliferasyonunu ve yara onarımı üzerine etkileri incelenmiştir. Kene tükürük bezi kenelerden alındıktan sonra besiyerine eklenmiş ve 24 saat süreyle hücre kültür kaplarında konflue olmuş hücrelere uygulanmıştır. Hücre canlılığı için ayrı ayrı 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına AF/NP ve kıkırdak hücreleri ekilmiş konflue olduktan sonra 20, 40, 60 µg konsantrasyonlarında kenenin tükürük bezi her bir kuyucuğa eklenmiştir. Yara onarımı için 6 kuyucuklu kültür kaplarına AF/NP ve kıkırdak hücreleri ekilip konflue olduktan sonra mikropipet ucu yardımıyla yarıklar açılmış ve 20, 40, 60 µg konsantrasyonlarında tükürük içeren besiyerleri ile muamele edilmiştir (Şekil 3.3.1 ve Şekil 3.3.2).

Uygulama yapılan kültürlerde AF/NP hücresi için 40 µg konsantrasyonda %2’lik bir artış yaşanırken 20 µg’da %23, 60 µg’da %27 oranında bir azalma görüldü. Kıkırdak hücresi için ise 20 µg’da %5 artış; 40 µg’da %25, 60 µg’da %26 oranlarında azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca kültürler AO/PI ile boyanarak floresan mikroskop ile incelenmiştir. Floresan mikroskop ile incelenen hücreler kontrol gruplarıyla kıyaslandıklarında ölüm oranının arttığı görülmemiştir. (Şekil 3.2.1, Şekil 3.2.2)

Mikropipet yardımıyla yara açılan kültür kaplarındaki hücrelerin yara iyileşmeleri 24 saat sonunda incelenmiştir. Kontrol grubu ve dozlarda AF/NP hücresi için, 60 µg’da değişiklik gözlemlenmezken 20 µg ve 40 µg’da yara kapanması büyük orandadır (Şekil 3.3.1 ve Şekil 3.3.2). Kondrosit hücreleri içinse kontrol grubuna kıyasla dozlar net bir biçimde kapanma görülmedi.

Bundan sonraki süreç için; AF/NP hücresinde hücre canlılığının 40 µg’da %2’lik bir artış olduğunu 20 µg’da %23 bir azalış olduğu görüntülendi. Bu hücre tipi için 30-40 µg’da daha detay bir doz aralığında tekrar çalışmalar yapılabilir. Ayrıca yara iyileşme gözlemlerinin de başarılı olduğunu gözlemliyoruz. Daha ara dozlarda uzun süreli gözlemler yapılabilir.

Kondrosit hücreleri hassas hücreler olduğu için bu hücre tipinde çalışmakta zorluklar yaşanmıştır. MTT sonuçlarına bakıldığında hücre profilerasyonunun desteklendiğini söyleyebiliriz, ara dozlarda takibinin yapılması gerekmektedir.

Sonuçlara baktığımızda olumlu veriler elde ettiğimizi görüyoruz. Farklı hücre tiplerinde *Hylomma aegyptium* kenesinin tükürük bezleri farklı dozlarda denenmelidir. Deney hayvanlarında çalışmalar yapılmalıdır, deney hayvanları çalışmalarından önce organoid doku kültürlerinde denemeler yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Ak, M. (2017). Yörüklerde Halk Hekimliği. *International Journal of Social Science*, 57, 395-405.
- Akça, İ. (2019). Böcek Morfolojisi ve Fizyolojisi. 19 Mayıs Üniversitesi: avys.omu.edu.tr.
- Alexandra, S., Valdes, J.J., Kotsyfakis, M. (2012). The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3(3), 117-127.
- Andrade, B.B., Teixeira, C.R., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2005). Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 77(4), 665–693.
- Andrade, F., Albuquerque, J., & Nascimento, A.V. (2016). 3.5 - Cell-based in vitro models for pulmonary permeability studies. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies. Cell and Tissue Based in Vitro Culture Models*, Pages 101-113.
- Anonim (2021a). Advantages and Disadvantages of Using Primary Cells in Cell Culture. Kosheeka Powering Research: <https://kosheeka.com/advantages-and-disadvantages-of-using-primary-cells-in-cell-culture/>.
- Anonim (2021b). Types of Ticks. <https://www.lymedisease.org/types-of-ticks/>.
- Archer, C.W., & Francis-West, P. (2003). The chondrocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(4), 401-404.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., De Cristofaro, R., & Menegatti, E. (2003). The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Current protein & peptide science*, 4(3), 231–251.
- Bachelierie, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A.M., Combadiere, C., Farber, J. M., Graham, G. J., Horuk, R., Sparre-Ulrich, A.H., Locati, M., Luster, A. D., Mantovani, A., Matsushima, K., Murphy, P.M., Nibbs, R., Nomiyama, H., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Rosenkilde, M.M., Rot, A., Sozzani, S., Thelen M., Yoshie O., Zlotnik, A. (2013). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews*, 66(1), 1–79.
- Bakogiannis, C., Sachse, M., Stamatelopoulos, K., & Stellos, K. (2019). Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine*, 122, 154157.
- Barradas, P.F., Lima, C., Cardoso, L., Amorim, I., Gärtner, F., & Mesquita, J. R. (2020). Molecular Evidence of Hemolivia mauritanica, Ehrlichia spp. and the Endosymbiont Candidatus Midichloria Mitochondrii in Hyalomma aegyptium Infesting Testudo graeca Tortoises from Doha, Qatar. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(1), 30.
- Benjamin, M., Archer, C.W., & Ralphs, J.R. (1994). Cytoskeleton of cartilage cells. *Microscopy Research and Technique*, 25(5), 372-377.
- Bochenek, M.A., Delcassian, D., & Anderson, D.G. (2020). Chapter 22 - Challenges in the development of immunoisolation devices. *Principles of Tissue Engineering (Fifth Edition)*, Pages 403-418.
- Bonvin, P., Power, C.A., & Proudfoot, A.E. (2016). Evasins: Therapeutic Potential of a New Family of Chemokine-Binding Proteins from Ticks. *Frontiers in immunology*, 7, 208.

- Bowman A., Nuttall P. (2008). Ticks: Biology, Disease and Control Cambridge University Press; 2008:506. ISBN: 9780521867610.
- Bowman, A.S., Coons, L.B., Needham, G.R., & Sauer, J.R. (1997). Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Medical and veterinary entomology*, 11(3), 277–285.
- Braunersreuther, V., Montecucco, F., Pelli, G., Galan, K., Proudfoot, A.E., Belin, A., Vuilleumier, N., Burger, F., Lenglet, S., Caffa, I., Soncini, D., Nencioni, A., Vallée, J.P., Mach, F. (2013). Treatment with the CC chemokine-binding protein Evasin-4 improves post-infarction myocardial injury and survival in mice. *Cardiovascular Biology and Cell Signalling*, 110(04): 807-825.
- Chmelar J., Calvo E., Pedra J.H.F., Francischetti I.M.B., Kotsyfakis M. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*, 75(13), 3842-3854.
- Chmelar, J., Kotal, J., Langhansova, H., Kotsyfakis, M. (2017). Protease Inhibitors in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystatins in Tick-host-Pathogen Interaction. *Frontiers In Cellular and Infection Microbiology*, 7: 216.
- Collis M.G. (1989). The vasodilator role of adenosine. *Pharmacology & therapeutics*, 41(1-2), 143–162.
- Creighton, I.T.E., Charles G.I. (1987). Sequences of the genes and polypeptide precursors for two bovine protease inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 194 (1)11-22.
- Cupp E.W. (1991). Biology of ticks. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 21(1), 1–26.
- Davis, C.P. (2021). Ticks (Tick Bites). *MedicineNet*. <https://www.medicinenet.com/ticks/article.htm>.
- Déruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A.L., Dias, J.M., Coelho, F.M., Russo, R.C., Ferreira B.R., Graham G.J., Shaw J.P., Wells T.N.C., Teixeira M.M., Power C.A., Proudfoot, A.E.I. (2008). Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *Journal of Experimental Medicine*, 205 (9): 2019–2031.
- DeSai, C., Reddy, V., & Agarwal, A. (2021). Anatomy, Back, Vertebral Column. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Dias, J.M., Losberger, C., Déruaz, M., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Shaw, J.P. (2009). Structural Basis of Chemokine Sequestration by a Tick Chemokine Binding Protein: The Crystal Structure of the Complex between Evasin-1 and CCL3, *PlosOne*: 4(12):e8514.
- Dowdell, J., Erwin, M., Choma, T., Vaccaro, A., Iatridis, J., Cho, S.K. (2017). Intervertebral Disk Degeneration and Repair. *Neurosurgery*. Mar 1;80(3S):46-54.
- Fezza, F., Dillwith, J.W., Bisogno, T., Tucker, J.S., Marzo, V.D., Sauer, J.R. (2003). Endocannabinoids and related fatty acid amides, and their regulation, in the salivary glands of the lone star tick. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1633 (1), 61-67.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Missé, D., Pagès, F., Fusai, T., Rogier C., Almeras, L. (2011). Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites Vectors*, 4, 187.

- Francischetti, I. M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., & Ribeiro, J.M. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14(6), 2051–2088.
- Frauenstuh, A., Power, C.A., Déruaz, M., Ferreira, B.R., Silva, J.S., Teixeira, M.M., Dias, J. M., Martin, T., Wells, T.N.C., & 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.
- Freshney, R. I. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th Edition, Chapter 12: Primary Culture.
- Gibson, A.K., Smith, Z., Fuqua, C., Clay, K., Colbourne, J.K. (2013). Why so many unknown genes? Partitioning orphans from a representative transcriptome of the lone star tick *Amblyomma americanum*. *BMC Genomics*, 14(1):135.
- Guzelant, A.Y., Isyar, M., Yilmaz, İ., Sirin, D.Y., Cakmak, S., Mahirogullari, M. (2017). Are chondrocytes damaged when rheumatologic inflammation is suppressed? *Drug Chem Toxicol.*;40(1):13-23.
- Güner, E.S., 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 (Reading, England)*, 149(Pt 9), 2539–2544.
- Hackenberg, M., & Kotsyfakis, M. (2018). Exosome-Mediated Pathogen Transmission by Arthropod Vectors. *Trend in Parasitology*. 34 (7) 549-552.
- Harris, C.L, Fraser, D.A, & Morgan, B.P (2002). Tailoring anti-complement therapeutics. *Biochemical Society transactions*, 30(Pt 6), 1019–1026.
- Hepburn, N.J., Williams, A.S., Nunn, M., Chamberlain-Banoub, J., Hamer, J., Morgan B.P., Harris, C.L. (2007). In Vivo Characterization and Therapeutic Efficacy of a C5-specific Inhibitor from the Soft Tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (11), 8292–8299.
- Kazimírová, M., & Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3: 43.
- Kemp, D.H., Stone, B.F., & Binnington K.C. (1982). *Physiology of Ticks*. CHAPTER 4 - Tick Attachment and Feeding: Role of the Mouthparts, Feeding Apparatus, Salivary Gland Secretions and the Host Response, Pages 119-168.
- Kengla, C., Kidiyoor, A., & Murphy, S. (2017). *Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration*. <https://onlinelibrary.wiley.com/>.
- Kocabay, A. (2018). *Embriyonal Fare Hücrelerinde Kene Tükürük Bezi Ekstraktının Etkisi*. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Kotsyfakis, M., Schwarz, A., Erhart, J., & Ribeiro, J.M.C. (2015). Tissue- and time-dependent transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. *Scientific Reports*, 5, 9103.
- Kumar, V., & Sharma, A. (2009). Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *European journal of pharmacology*, 616(1-3), 7–15.

- Labuda, M., Trimnell, A.R., Ličková, M., Kazimírová, M., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttall, P.A. (2006). An Antivector Vaccine Protects against a Lethal Vector-Borne Pathogen. *Plos Pathogens*, 2(4), e27.
- Mahaffey, K.W., Van de Werf, F., Shernan, S.K., Granger, C.B., Verrier, E.D., Filloon, T.G., Todaro, T.G., Adams, P.X., Levy, J.H., Hasselblad, V., & Armstrong, P.W. (2006). Effect of pexelizumab on mortality in patients with acute myocardial infarction or undergoing coronary artery bypass surgery: a systematic overview. *American heart journal*, 152(2), 291–296.
- Maldonado-Ruiz, L.P., Montenegro-Cadena, L., Blattner, B., Menghwar, S., Zurek, L. And Londono-Renteria, B. (2019). Differential Tick Salivary Protein Profiles and Human Immune Responses to Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*) From the Wild vs. a Laboratory Colony. *Front. Immunol.* 10:1996.
- Mann, K.G, Butenas, S., & Brummel, K. (2003). The Dynamics of Thrombin Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(1), 17-25.
- Maritz-Olivier, C., Stutzer, C., Jongejan, F., Neitz, A.W., & Gaspar, A.R. (2007). Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends in parasitology*, 23(9), 397–407.
- Martins, L.A., Kotál, J., Bensaoud, C., Chmelař, J., & Kotsyfakis, M. (2020). Small protease inhibitors in tick saliva and salivary glands and their role in tick-host-pathogen interactions. *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*, 1868(2), 140336.
- Messner, P., & Antwerpes, F. (2019,). *Hyalomma aegyptium*. DoccheckFlexikon: https://flexikon.doccheck.com/de/Hyalomma_aegyptium.
- Moon, S. M., Yoder, J. H., Wright, A. C., Smith, L. J., Vresilovic, E. J., & Elliott, D. M. (2013). Evaluation of intervertebral disc cartilaginous endplate structure using magnetic resonance imaging. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, 22(8), 1820–1828.
- Numao, S., Etienne, G., Malojcic, G., Schmidt, E., & Dumelin, C.E. (2022). Comprehensive Pharmacology. Chapter 2.22 - Compound Screening (442-475), Elsevier.
- Nunn, M.A., Sharma, A., Paesen, G.C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A.C., & Nuttall, P.A. (2005). Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 174(4), 2084–2091.
- Nuttall P.A. (2019). Wonders of tick saliva. *Ticks and tick-borne diseases*, 10(2), 470–481.
- Nuttall, P.A., & Labuda, M. (2004). Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129(S1), S177 - S189
- Oliveira, C.J.F. , Sá-Nunes, A., Francischetti, I.M.B., Carregaro, V., Anatriello, E., Silva, J.S. Santos, I.K.F. M., Ribeiro, J.M.C., Ferreira B.R. (2011). Deconstructing Tick Saliva. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13)10960-10969
- Parizi, L.F., Ali, A., Tirloni, L., Oldiges, D.P., Sabadin, G.A., Coutinho, M.L., Seixas, A., Logullo, C., Termignoni, C., & DA Silva Vaz, I., Jr (2018). Peptidase inhibitors in tick physiology. *Medical and veterinary entomology*, 32(2), 129–144.

- Paveglio, S.A., Allard, J., Mayette, J., Whittaker, L. A., Juncadella, I., Anguita, J., & Poynter, M.E. (2007). The tick salivary protein, Salp15, inhibits the development of experimental asthma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(11), 7064–7071.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X.F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M.V., Kantor, F.S., Anderson, J.F., Koski, R.A., & Fikrig, E. (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, 436(7050), 573–577.
- Ribeiro, J.M., & Mather, T.N. (1998). Ixodes scapularis: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Experimental parasitology*, 89(2), 213–221.
- Riding, G.A., Jarmey, J., McKenna, R.V., Pearson, R., Cobon, G.S., & Willadsen, P. (1994). A protective "concealed" antigen from Boophilus microplus. Purification, localization, and possible function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(11), 5158–5166.
- Scholl, D.C., Embers, M.E., Caskey, J.R., Kaushal, D., Mather, T.N., Buck, W.R., Morici, L. A., & Philipp, M.T. (2016). Immunomodulatory effects of tick saliva on dermal cells exposed to Borrelia burgdorferi, the agent of Lyme disease. *Parasites & vectors*, 9(1), 394.
- Sevimli, Ş., & Kadioğlu, S. (2002). Çukurova Sağlık Folklorunda Kaplumbağa. VI. Türk Eczacılık Tarihi Toplantısı, İstanbul.
- Steen, N.A., Barker, S.C., & Alewood, P.F. (2006). Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 47(1), 1–20.
- Stibrániová, I., Lahová, M., & Bartíková, P. (2013). Immunomodulators in tick saliva and their benefits. *Acta virologica*, 57(2), 200–216.
- Stockwell, R.A. (1979). *Biology of Cartilage Cells*. Cambridge University Press.
- Stone, B.F, Commins, M.A, & Kemp, D.H (1983). Artificial feeding of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. *International Journal for Parasitology*, 13 (5)447-454
- Turk, V., Stoka, V., & Turk, D. (2008). Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 5406–5420.
- Urits, I., Capuco, A., Sharma, M., Kaye, A.D., Viswanath, O., Cornett, E.M., Orhurhu, V.(2019). Stem Cell Therapies for Treatment of Discogenic Low Back Pain: a Comprehensive Review. *Curr Pain Headache Rep*. Jul 29;23(9):65.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Galperin, M.Y., & Ribeiro, J.M. (1998). Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug Cimex lectularius. A new type of nucleotide-binding enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 273(46), 30583–30590.
- Vlasuk, G.P., Ramjit, D., Fujita, T., Dunwiddie, C.T., Nutt, E.M., Smith, D.E., & Shebuski, R. J. (1991). Comparison of the in vivo anticoagulant properties of standard heparin and the highly selective factor Xa inhibitors antistasin and tick anticoagulant peptide (TAP) in a rabbit model of venous thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*, 65(3), 257–262.
- Wang, H., Nuttall, P. A. (1999). Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 56, 286–295.
- Wang, T., Zhang, S., Pei, T., Yu, Z., & Liu, J. (2019). Tick mitochondrial genomes: structural characteristics and phylogenetic implications. *Parasites & Vectors*, 12: 451.

- Waxenbaum, J.A., Reddy, V., & Futterman, B. (2022). Anatomy, Back, Intervertebral Discs. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Waxman, L., Smith D.E., Arcuri, K.E., Vlasuk, G.P. (1990). Tick Anticoagulant Peptide (TAP) Is a Novel Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa. *Science*, 248(4955), 593-596.
- Wen S., Wang F., Ji Z., Pan Y., Jian M., Bi Y., Zhou G., Luo L., Chen T., Li L., Ding Z., Abi M-E., Liu A., Bao F. (2020). Salp15, a Multifunctional Protein From Tick Saliva With Potential Pharmaceutical Effects. *Frontiers in Immunology*, 10: 3067.
- Wikel, S. (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers In Microbiology*, 4: 337.
- Wikel, S., Bergman, D. (1997). Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*. 13 (10), 383-389.
- Zhang, S. (2019). What Tick Saliva Does to the Human Body. *The Atlantic*, <https://www.theatlantic.com/science/archive/2019/07/the-marvels-of-tick-saliva/594652/>.
- Zhaohui, L. (2019). Comprehensive Biotechnology (Third Edition). *Reference Module in Biomedical Sciences*, Volume 5: 535-549.