



**EMBRİYONAL FARE HÜCRELERİNDE
KENE TÜKÜRÜK BEZİ EKSTRAKTININ
ETKİSİ**

AHMET KOCABAY

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Sırrı KAR
İkinci Danışman: Dr. Ali Cihan TAŞKIN**

2018

T.C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**EMBRİYONAL FARE HÜCRELERİNDE
KENE TÜKÜRÜK BEZİ EKSTRAKTININ ETKİSİ**

Ahmet KOCABAY

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Sırrı KAR

İKİNCİ DANIŞMAN: Dr. Ali Cihan TAŞKIN

TEKİRDAĞ-2018

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Sırrı KAR danışmanlığında ve Dr. Ali Cihan TAŞKIN ikinci danışmanlığında Ahmet KOCABAY tarafından hazırlanan “Embriyonal Fare Hücrelerinde Kene Tükürük Bezi Ekstraktının Etkisi” isimli bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Dr. Öğretim Duygu Yaşar ŞİRİN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Sırrı KAR

İmza:

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EMBRYONAL FARE HÜCRELERİNDE KENE TÜKÜRÜK BEZİ EKSTRAKTININ ETKİSİ

Ahmet KOCABAY

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sırrı KAR

II. Danışman: Dr. Ali Cihan TAŞKIN

Embriyonik kök hücreler (EKH), fare blastosist hücrelerinden 1981 yılında izole edilmesinin hemen ardından biyomedikal araştırmaların vazgeçilmez aracı haline gelmiştir. Ancak, kendini yenileme ve pluripotent özelliklerin düzenlenmesi noktasında hala bazı sorunlarla karşılaşabilmektedir. Kene tükürük salgısının; antihemostatik, immüno-modülatör aktiviteleri olan ve çok sayıda biyoaktif molekül içerdiği gösterilmiştir. Ayrıca önceki çalışmalarda; kene tükürük salgısının, mitojenle aktive olan protein kinazlarının (MAPK) ve hücre dışı sinyal düzenlenmesinde rol oynayan hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz (ERK1/2) yolaklarının aktivasyonu üzerindeki olumsuz etkileri de görülmüştür. Bu yolakların fEKH'lerin kendi kendini yenileme yeteneğine negatif etki ettiklerine dair kanıtlar vardır. Bu çalışmada, kene tükürük salgısının geleneksel fEKH kültür sistemi üzerine etkisini incelenmiştir. Bu amaçla; 3 farklı kene türünden (*Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa* ve *Hyalomma marginatum*) elde edilen, farklı konsantrasyonlardaki kene tükürük bezi ekstraktı, fEKH kültürüne uygulanmıştır. Bu deneylerde, daha önce CB6F1/J (Balb/c x C57BL/6J) ırkı deney farelerinden elde edilen blastosistlerden izole edilen fEKH'ler kullanılmıştır. Ekstraktların toksik dozunun incelenmesi için, 6 farklı konsantrasyonuna (0.2 µg/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 160 µg/ml) sahip olacak şekilde ayarlanmış kök hücre besiyerleri (Knock Out-DMEM+15% Knock Out-Serum) ile fEKH'ler 37 °C sıcaklıkta ve % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 7. gününde Cell Titer Glu (CTG) testi ile hücrelerdeki canlılık durumu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar; 80 µg/ml derişimde *D. marginatus* tükürük bezi ekstraktı destekli kültürün, fEKH'lerin çoğalma oranını olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Bu etkinin kanıtlanması ve hangi faktörler ya da proteinlerin fEKH proliferasyonuna etki ettiğinin anlaşılması için tamamlayıcı denemelere gereksinim duyulduğu anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Fare embriyonik kök hücre, kene tükürük salgısı, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz (ERK1/2), proliferasyon.

2018, 63 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

EFFECT OF SALIVARY GLAND EXTRACT OF TICKS ON MOUSE EMBRYONIC CELLS

Ahmet KOCABAY

Namık Kemal University in Tekirdağ
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sırrı KAR

Co-supervisor: Dr. Ali Cihan TAŞKIN

Embryonic stem cells (ESCs) were first isolated in 1981 from mouse blastocysts. Shortly after their discovery, mouse ESCs (mESCs) became an indispensable tool in biomedical research. However, regulation of self-renewing and pluripotency factors is often very inefficient. Most stem cell laboratories still rely on conventional culture methods to support the expansion and maintenance of mESCs. Tick (Acari: Ixodidae) saliva has been shown to contain a wide range of bioactive molecules with vasodilatory, antihemostatic, and immunomodulatory activities. Previous studies have demonstrated negative effect of the tick saliva on activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 pathways. Also there are evidences that activation of these pathways is negative regulator of mESCs' self-renewing. In this study we scrutinized the effect of tick saliva on traditional mESC culturing systems. In this study, to examine the toxic dose, extract of tick salivary gland were assayed on mESC cultures at different concentrations. mESCs lines isolated from CB6F1/J (Balbc X C57BL/6J) mice's blastocysts were cultured in stem cell mediums (Knock Out-KO DMEM+15 % KO Serum Replacement) with 6 different extract concentrations (0.2 µg/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 160 µg/ml) of 3 different species from ticks (*D. marginatus*, *R. bursa* and *H. marginatum*) in 37 °C and 5 % CO₂ incubator for 7 days. Viable cells were detected with Cell Titer Glu (CTG) assay. Our results suggest that traditional mESCs medium supplemented with 80 µg/ml tick saliva from *D. marginatus* have positive effect on mESCs' proliferation rate. Beside that, to understand which factor or proteins in tick saliva affect proliferation and maintenance of mESCs, proteomics analysis and some other experiments are needed.

Keywords: Mouse embriyonic stem cells, ticks saliva, mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), proliferation.

2018, 63 pages

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında her türlü katkı ve desteğiyle yanımda olan Koç Üniversitesi, Deneysel Hayvanlar Laboratuvarları koordinatörü Dr. Ali Cihan Taşkın'a; deneylerimi laboratuvarında sürdürme imkanı veren Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Tamer Önder'e; araştırmalarımın her aşamasında bilgi ve manevi destekçim olan Haliç Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Dr. Öğretim Üyesi Ayyub Ebrahimi'ye; son olarak, tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimimde, çabalarımın destek olan, zor zamanlarımı büyük anlayış ve olgunlukla karşılayan, her zaman yapıcı olan, bilimsel birikimini benimle paylaşan, bir ağabey gibi yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Sırrı Kar'a teşekkür ederim.

TEKİRDAĞ – 2018

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

EKH	: Embriyonik Kök Hücre
mEKH	: Fare Embriyonik Kök Hücre
MAPK	: Mitojenle Aktive olan Protein Kinazları
ERK1/2	: Hücre dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz
CTG	: Cell Title Glu
FEF	: Fare Embriyonik Fibroblast
PGF2alfa	: Prostaglandin F2alpha
PGE2	: Prostaglandin E2
RTAP	: Recombinant Protein Tick Anticoagulant Peptide
APTT	: Aktive Edilmiş Parsiyel Tromboplastin Zamanı
VEGF-A	: Vasküler Büyüme Faktörü A
iPS	: Induced Pluripotent Stem
İHK	: İç Hücre Kitleciği
FBS	: Fetal Bovine Serum
LIF	: Leukemia Inhibitory Factor
BCA	: Protein Concentration Assay
BSA	: Bovine Serum Albumin
PBS	: Phosphate Buffered Saline
KOSR	: Knock Out Serum
BRL	: Buffalo-Rat Liver
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
mm	: Milimetre

°C : Derece selsius

qPCR : Quantitative Real-time polymerase chain reaction



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1. Keneler.....	2
2.1.1. Kenelerde morfoloji ve biyoloji	2
2.1.2. Kenelerde tükürük salgısı	5
2.1.3. Kene tükürüğünün klinik kullanım potansiyeli	11
2.1.4. Kene tükürük ve tükürük bezinin eldesi, analizi ve kullanım alanları	13
2.2. Kök Hücre	15
2.2.1. Kök hücre tarihçesi.....	15
2.2.2. Kök hücre tanımı ve özellikleri	16
2.2.3. Kök hücre tipleri.....	17
2.2.4. Kök hücre kullanım alanları	19
2.2.5. Embriyonik kök hücre	21
2.3. In Vitro Kültür Teknolojisi.....	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	23
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	24
3.3. Çalışmada Kullanılan Keneler ve Üretimleri	26
3.4. Kenelerden Tükürük Bezlerinin Eldesi	26
3.5. Kene Tükürük Bezi Ekstraktlarının Hazırlanması	28
3.6. Tükürük Bezi Ekstraktında Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	29
3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	30
3.7.1. Besiyerlerinin hazırlanması	30

3.7.2. Tükürük bezi ekstraktlarının fEKH üzerine uygulanması.....	32
3.7.3. CTG Testi İle Hücre Canlılık Oranlarının Belirlenmesi	33
3.7.4. Verilerin istatistiksel analizleri.....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
4.1. <i>H. marginatum</i> tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerin canlılığı üzerine etkisi	37
4.2. <i>R. bursa</i> tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerin canlılığı üzerine etkisi	38
4.3. <i>D. marginatus</i> tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerin canlılığı üzerine etkisi.....	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	41
6. KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	53



ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kök hücre çeşitleri.....	18
Şekil 3.1. Çalışma sırasında, kene tükürük bezi eldesi öncesindeki görüntü.....	27
Şekil 3.2. Petriye alınmış kene tükürük bezleri.....	28
Şekil 3.3. BCA testi aşamaları.....	29
Şekil 3.4. Çalışmada, kene tükürük salgısının fEKH'leri üzerine uygulanmasını günlük gösteren diyagram.....	33
Şekil 3.5. CTG testi sırasında gerçekleşen reaksiyon.....	34
Şekil 4.1. Kene tükürük bezinin steryomikroskop görüntüsü.....	35
Şekil 4.2. CTG testine göre, farklı doz ve uygulama sürelerinde, <i>H. marginatum</i> tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine etkisi.....	37
Şekil 4.3. CTG testine göre, farklı doz ve uygulama sürelerinde, <i>R. bursa</i> tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine etkisi.....	38
Şekil 4.4. CTG testine göre, farklı doz ve uygulama sürelerinde, <i>D. marginatus</i> tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine etkisi.....	40

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kök hücre çalışmalarından bazılarının yıllara göre dağılımı.....	16
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	23
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler.....	24
Çizelge 3.3. BCA testinde kontrol grup derişimlerini ayarlarken kullanılan konsantrasyon örnekleri.....	30
Çizelge 3.4. Kene tükürük bezi ekstraktı katkılı EKH besi yeri hazırlarken kullanılan hacimlere göre sabitlenmiş protein konsantrasyonu bilgileri.....	31
Çizelge 3.5. CTG testine göre, <i>H. marginatum</i> tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine olan etkisinin ışına verileri.....	36
Çizelge 3.6. CTG testine göre, <i>R. bursa</i> tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine olan etkisinin ışına verileri.....	38
Çizelge 3.7. CTG testine göre, <i>D. marginatus</i> tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine olan etkisinin ışına verileri.....	39

1. GİRİŞ

Embriyonik kök hücreler (EKH), ilk defa fare blastosist hücrelerinden 1981 yılında izole edilmiştir. Vücudumuzda yaşlanarak işlev göremeyecek hale gelen ve ölen hücrelerin yerlerine yenileri oluşturulmaktadır. Bunlarla birlikte, yabancı antijenlerle savaşmak için vücut özel savunma hücreleri üretmektedir. Farklı doku ve organlarımızdaki hücreler farklı görevler için özelleşmişlerdir. Bu bilgiler dahilinde, canlı vücudundaki bütün hücrelerin ilk ana hücresi “kök hücre” lerdir. Bu hücreler farklı hücrelere dönüşebilirler. İlgili nedenden dolayı biyomedikal ve tıp alanında kök hücreler vazgeçilmez bir deney materyali haline gelmiştir. Günümüzde; organ nakli, otoimmün sistemi hastalıkların tedavisinde, sinir sisteminin yeniden oluşturulması vb. gibi çalışma alanları vardır. Pluripotent özellikteki embriyonik kök hücreler; kendini yenileme kapasitesine sahip olup, 3 farklı germ hücre tabakasını da oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Ancak, kendini yenileme ve pluripotent özelliklerin düzenlenmesi noktasında henüz ideal düzey yakalanabilmiş değildir.

Keneler zorunlu ektoparazit canlılardır. Kene tükürük bezi ekstraktının kimyasal içeriği irdelendiğinde, proteyin ve enzim açısından zengin oldukları görülmektedir. İçerisinde 200’ ü aşkın aktif molekül bulunmaktadır. Bunlara ilaveten; antihemostatik, immüno-modilatör özelliktedirler. MAPK ve ERK1/2 yolaklarının aktivasyonu üzerinde olumsuz etkilerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ferreira ve Silva 2010). Bu yolakların inhibisyonunun EKH’ lerin pluripotent özelliklerini olumlu yönde etkilediği bilinmektedir.

Son yıllarda, EKH için kültür sistemlerinin iyileştirilmesine yönelik kapsamlı gelişmeler kaydedilmiştir. Hücrelerin, kendini yenilemeleri ve proliferasyon özelliklerini arttırıcı yollar denenmiştir ki kültür koşulları, pozitif etki yapan bu değişimlerle mevcut şeklini almıştır (Kansu 2006; Sağsöz ve Ketani 2008).

Bu çalışmada; 3 farklı kene türünden (*D. marginatus*, *R. bursa* ve *H. marginatum*) elde edilen, farklı konsantrasyonlardaki kene tükürük bezi ekstraktının, fEKH besi yerine karıştırılarak, hücre kültürü üzerine etkileri incelenmiştir. İlgili çalışma ile kene tükürük salgısının fEKH’lerin proliferasyonunu üzerinde arttırıcı bir rol oynayıp oynamadığı sorusunun aydınlığa kavuşturulması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Keneler

2.1.1. Kenelerde morfoloji ve biyoloji

Keneler, subtropikal ve tropikal bölgeler başta olmak üzere, hemen bütün dünyada yaygın olarak görülürler. Dünya genelinde yaklaşık 900 kadar kene türünden söz edilmektedir. Bunlardan 720'si Ixodidae, 186'sı Argasidae ve 1'i ise Nuttalliellidae ailesine aittir (Barker ve Murrell 2004). Türkiye, keneler açısından, coğrafik ve iklimsel özellikleri bakımından oldukça uygun bir konumdadır. Ülkemizde bugüne kadar 50'ye yakın kene türünden söz edilmiştir. Bunlardan bazıları şunlardır: Ixodidae ailesinden *Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *I. gibbosus*, *I. accuminatus*, *Hyalomma anatolicum*, *H. excavatum*, *H. detritum*, *H. marginatum*, *H. aegyptum*, *H. dromedarii*, *Rhipicephalus bursa*, *R. turanicus*, *R. sanguineus*, *Haemaphysalis punctata*, *H. parva*, *H. sulcata*, *H. numidiana*, *H. inermis*, *H. concinna*, *Dermacentor marginatus*, *D. niveus*, *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus*, *B. kohlsi*, Argasidae ailesinden ise *Ornithodoros (Argas) lahorensis*, *O. tholozani*, *O. conciceps*, *Argas persicus*, *A. reflexus*, *A. vespertilionis* ve *Otobius megnini*'dir (Hoffman ve ark. 1971; Mimioğlu 1973; Özcel ve Daldal 1997; Karaer ve ark. 1997; Aydın ve Bakırcı 2007; Bursali ve ark. 2012; Kar ve ark. 2017). Anadolunun keneler için uygun özelliklere sahip olması, ülkemizi kene aracılı hayvan ve insan hastalıkları açısından riskli bir konuma getirmektedir. Diğer yandan, birçok kene türünün ülkemizde yerleşik olması ve habitatın bir parçası konumunda bulunması, keneye ilgili çalışmaların daha kolay bir şekilde gerçekleştirilmesine de imkan vermektedir. Biyogüvenlik noktasında belli bir konuma gelmiş ülkelerde, endemik olmayan keneler ve kene ile ilgili hastalıklarla çalışmak yüksek güvenlik düzeyine sahip laboratuvarlarda mümkün olmaktadır. Bu nedenle, belli bilgi birikimi ile laboratuvar denemeleri gerektiren kene çalışmaları, belli başlı birkaç tür (*Amblyomma americanum*, *A. variegatum*, *Ixodes scapularis*, *I. pacificus*, *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus microplus*, *R. appendiculatus*, *Boophilus microplus*, *Ornithodoros moubata* vs.) üzerinde yoğunluk kazanmıştır (Francischetti 2010; Tirloni ve ark. 2015). Öte yandan, biyolojik, morfolojik ve ekolojik açıdan birbirinden oldukça farklı olan kene türlerinin, fizyolojik açıdan da oldukça farklı özellikler taşıdığı bilinmektedir (Gern 2005).

Mera kenelerinde (Ixodidae) yumurta, larva, nimf ve ergin olmak üzere dört gelişim evresi bulunur. Vücutları tek parçadan oluşur; vücut dışına larvada üç, nimf ve erginde dört çift bacak ve önde yer alan ağız organelleri çıkar. Ağız organellerini ortada bir hypostom, bunun

yanlarında iki şeliser ve en dışta iki palpten oluşur. Aç ergin kenelerin büyüklüğü, türe ve larva-nimf dönemindeki beslenme durumuna göre değişmekte olup, genellikle 2-7 mm uzunluğundadır. Türe ve gelişim dönemine göre belli konak veya konakları tercih eden mera kenelerinde yaşamın % 95'i bu konakların dışında geçer. Yumurtadan çıktıktan sonra, her gelişme dönemlerinde, gömlek değiştirip bir sonraki aşamaya geçmek ve ergin evrede de yumurtlamak amacıyla konağından kan emmek zorundadır. Bazı keneler bütün aktif dönemlerini tek konakta geçirirler ki bunlara tek konaklı keneler denir. Bazıları ise, genç dönemleri ve ergin dönemi ayrı olmak üzere iki konakta (iki konaklı keneler), bazıları her dönemini ayrı birer konakta geçirir (üç konaklı keneler). Beslenme süresi kenenin türüne, konağın türüne, kenenin gelişim dönemine vs. bağlı olarak değişir. Genellikle; ortalama beslenme süresi larvalarda 3-5 gün, nimflerde 4-8 gün, erginlerde ise 5-20 gün kadardır. Birçok kene türünde, erkek ve dişi ergin keneler konakta birlikte beslenir. Bu süre içerisinde de çiftleşir. Doymasını tamamlayan dişi kene konağını bırakır ardından zemine düşer ve uygun bir ortama saklanarak yumurtalama sürecine girer (Sonenshine 1991).

Konağına tırmanan aç keneler, palpleri yardımıyla, türüne ve gelişim dönemine göre farklılık gösteren uygun bir beslenme alanı bulur. Şeliserleri ile deriyi deler, şeliserlerini ve hipostomunu deri içerisine, dermisin yüzey katlarına yerleştirir. Bu pozisyonunu beslenme süresince korur. Tutunma olayı, hem hipostom üzerinde bulunan ters dişçikler, hem de kene tarafından tutunmayı takiben başlayan, beslenmenin ilk günlerinde salgılanmakta olan özel bir tükürük salgısı (semen) sayesinde mümkün olur. Sementin, ağız organellerini düzen içinde tutmak ve ağız organelleriyle konak dokusu arasındaki teması aza indirmek gibi görevleri de vardır. Tutunmayı takiben salgılanmaya başlayan, sement harici tükürük, tam olarak ulaşamadığı kılcal damarları kanın sızacağı bir duruma getirir ve sızan kan hemen ağız organellerinin civarında toplanır; nihayetinde, kene dokuda biriken bu kanı hipostomuyla çekerek beslenir (havuz tipi beslenme). Beslenme sırasında salgılanan tükürüğün anestezi etkisinden dolayı kene konak tarafından genellikle fark edilmez. Bazı türlerin dişileri 80-100 ml kan emebilmektedir. Öte yandan, kenenin emdiği kanı konsantre etmesi özelliği vardır. Beslenirken fazla miktarda plazmalı kanı emen kene (ağırlığının 200-600 katı), aynı süreç dahilinde, emdiği kanın sıvı kısmını, tükürük salgısıyla tekrar konağına verir. Yapılan araştırmalarda, doymuş kenenin, ihtiva ettiğinden % 80 daha fazla kan emmiş olduğunu, ancak bunun % 75'ini konağına tekrar verdiğini, geri kalan kısmını ise dışkı vs. ile kaybettiğini göstermiştir (Sauer ve ark. 2000; Tu ve ark. 2005; Coons ve Rothschild 2008).

Kenelerin beslenme süreci; hazırlık aşaması, yavaş beslenme periyodu ve hızlı beslenme periyodu olarak üç temel süreçten oluşur. Hazırlık aşaması olan ilk 1-2 gün kene konağa tutunur, sementi salar ve diğer salgılarının da etkisiyle beslenme ortamını şekillendirir. Ardından, yavaş beslenme aşaması olan 6-9. günde, kene düşük miktarlarda kan emer, ağırlığı yaklaşık 10 kat artar, dişi keneler bu aşamada çiftleşmeye başlar, beslenme alanında hücresel bazı organizasyonlar gelişir. Kenelerin taşıdığı olası etkenler de çoğunlukla bu aşamada verilmeye başlanır. Hızlı beslenme aşamasında ise oldukça etkili bir kan emme sürecine girilir. Bu dönem 24 saat gibi kısa sürse de, konaktan emilen kanın yaklaşık 2/3'ü bu dönemde emilir. Yavaş ve hızlı beslenme arasındaki geçiş sırasında ağırlıkta yaklaşık 10 katlık bir artış şekillenir. Kritik bir öneme sahip olan bu artış sadece çiftleşmiş dişilerde söz konusu olmaktadır (Coons ve Rothschild 2008; Sojka ve ark. 2013).

Kenelerde, bir çift tükürük bezi bulunur. Vücudun ön tarafından başlayıp iki yandan geriye doğru uzanan oldukça büyük yapıdaki bu bezler, üzüm salkımı taneleri şeklinde görünen asinilerden oluşmuştur. Asinilerde bulunan özel hücrelerde salgılanan tükürük, küçük kanalcıklarla, ağız organellerine doğru uzanan ve farinkse açılan büyük kanallara, oradan da hipostom içerisinden konağa aktarılır. Tükürük bezinde bulunan asiniler temel olarak ikiye ayrılır. Bunlar; agranüler (tip 1) ve granüler (sekretorik) asinilerdir. Granüler asinilerin tip 2 (A, B ve C hücre tipleri bulunur), tip 3 (ixoditlere özgü olup D, E ve F hücre tipleri bulunur) ve tip 4 (sadece ixoditlerin erkeklerinde bulunur) olmak üzere üç alt tipi vardır (Sonenshine 1991; Mans ve ark. 2004; Maritz-Oliver ve ark. 2005). Tip-1 asini hücreleri, ixoditlerde lipit damlacıkları, argasidlerde ise glikojen depoları içerir. Bu depolar beslenme sırasında boşalarak tükürük aracılığı ile konağa aktarılır (Sauer ve ark. 2000). Tükürük bezinin önemli bir kısmını oluşturan granüler asiniler, ixoditlerde daha karmaşık bir yapıda olup ışık mikroskobunda rahatlıkla seçilebilen granüllere sahiptirler (Sonenshine 1991). Tükürük salgısında yer alan ve konaktaki yangısal reaksiyonlara karşı etki gösteren proteinlerin, özellikle tip-3 ve tip-2 asinilerden salgılandığı düşünülmektedir (Sauer ve ark. 2000). Ayrıca, kenenin konağa tutunmasında büyük önem taşıyan tükürüğün salınımı da başlıca tip-2 ve tip-3 asini tarafından gerçekleştirilir. Yine, *H. anatolicum*'da A, D ve E hücrelerinin sement salınımında rol alan asıl hücreler olduğu bilinmektedir. Sement salgılamayan *I. holocylus*'da D ve E hücreleri az sayıdadır, ancak bu hücrelerin yine de belli oranda işlevleri vardır. Tip-3 asinide merkeze yerleşmiş tek bir D hücresi bulunmaktadır. Kısa ağız organelli ve semente bağlı tutunma gücüne fazlaca ihtiyacı olan kenelerde (*B. microplus*, *R. appendiculatus* gibi) bu hücreler bir çifttir (Sonenshine 1991). Kenelerin beslenmeleri sırasında tükürük bezlerinde bulunan asini veya

hücrelerde sayısal olarak herhangi bir artış gözlenmez (Jaworski 2003). Ancak, asiniler ve hücreler; büyüklük, granül yapısı ve salgı bakımından değişiklik göstermektedir (Sauer ve ark. 2000).

Kenelerde tükürük bezinin beslenme haricinde başka önemli rolleri de bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları, su ve iyon dengesinin korunmasıdır. Beslenmeden inaktif formda bekleyen kenelerde bazı özel asinilerce higroskopik bir salgı üretilir. Bu salgı hipostomu sararak havadaki nemi absorbe eder. Daha sonra sıvılaştıran bu salgı, kene tarafından tekrar emilir. Böylelikle kene kendisini nemli tutarak, kurumaya karşı korunmuş olur. Ayrıca, beslenme sırasında konaktan gelen kanın sıvı kısmı ve içerdiği bazı moleküller bağırsaktan hemolenfe, oradan da tükürük bezlerine verilir; buradan da konağa geri aktarılır (Oliveira ve ark. 2013).

2.1.2. Kenelerde tükürük salgısı

Beslenme sürecinde salınan tükürüğün miktarı ve içeriği kenenin türüne, cinsiyetine, gelişim dönemine ve beslenmenin evresine bağlı olarak değişmektedir (Kotsyfakis ve ark. 2007; Narasimhan ve ark. 2007; Francischetti ve ark. 2009). Örneğin, erkek ve dişi tükürük salgısında ortak antijenler bulunmaktadır, ancak çoğunluğunun farklı olduğu ve genel olarak dişi salgısının daha kompleks bir yapı arz ettiği bildirilmiştir (Díaz-Martín ve ark. 2013). Aynı türe ait erkek ve dişi keneler konakta benzer reaksiyonlara neden olsa da, dişi kenelerde meydana gelen lezyonun büyüklüğü 5-10 kat daha fazladır (Brown ve ark. 1982; Gill 1986). Benzer farklılıklar nimf ve erginler arasında da kaydedilmiştir (Tirloni ve ark. 2015). Bazı hastalık etkenlerinin vektör kenenin tükürük bezi hücrelerinde bazı gen bölgelerini aktive ettiği ve tükürük kompozisyonunu konakta kendi lehine olacak şekilde manupule edebildiği bildirilmiştir (McNally ve ark. 2012).

Kene tükürük bezinde (Nunes ve ark. 2006) ve tükürüğündeki, kan emmeye bağlı olarak ortaya çıkan değişim, türe de bağlı olarak, özellikle beslenmenin 3. gününden itibaren artarak devam eder. Tükürük bezlerindeki sekresyon ilk 5-7 günde 60 kat, protein içeriği ise 15 kat daha fazla hale gelir ki bunda kan kaynaklı bir faktörün etkili olabileceği düşünülmektedir (Sonenshine 1991; Leboulle ve ark. 2002). Her ne kadar, tükürükte, beslenmeyle birlikte kalitatif bir artış olsa da, ixodidlerde kan emdikçe tükürük salgısının immunojenik etkisi azalır. Söz konusu immunojenik zayıflama, konak immun direnci karşısında keneye stratejik bir avantaj sağlayabilmektedir (Rolnikova ve ark. 2003). Kan emmenin başlamasıyla birlikte,

kenenin farklı amaçlar için kullanabileceği birçok antijenik yapının sentezi değişir, nicelik ve niteliklerinde farklılıklar olur. Kimi antijenler ise sadece beslenmenin belli dönemlerinde sentezlenir (Lomas ve ark. 1998; Jaworski 2003; Soares ve ark. 2005). Beslenmenin devam ettiği süreçte, kenenin yumurta gelişimi ve yumurtlama sürecinde işe yaramayacak, diğer bir ifadeyle, artık görevi bitmiş olan dokuları apoptozis aracılığı ile yıkımlanır (Freitas ve ark. 2007).

Kısmen ve tam doymuş kenelerde yapılan çalışmalar, tam doymuş kene tükürüğü miktarının, içerdiği yüksek miktarda sıvıdan dolayı, daha fazla olduğu, bununla birlikte protein konsantrasyonunun daha zayıf kaldığı görülmüştür. Diğer yandan, tam doymuş kenelerin tükürük salgılarında, protein çeşitliliği daha fazladır. Kısmen doymuş kene tükürük salgılarında; konağa ait proteinler, kene hücresine ait bazı proteinler ve sement yapımında rol alan glisinden zengin proteinler daha fazladır. Ferritin, antimikrobial özellik gösteren tripsin inhibitörü benzeri domain içeren protein-TIL gibi bazı diğer proteinler sadece tam doymuş kene tükürüğünde rastlanmaktadır. Konağa ait proteinlerin (aktin, histon ve diğer nükleer proteinler, HSP90, hemoglobin alt üniteleri) tam doymuş kenelerin tükürük salgısında daha az bulunması, bu tip molekülleri tükürük salgısıyla veya diğer yollardan elemine eden molekül ve mekanizmaların beslenme sürecinde aktive olmasıyla ilişkilendirilmiştir (Tirloni ve ark. 2014).

Dişi kenelerde, tükürük salgısını ve bağlı olarak da beslenme performansını etkileyen diğer bir önemli faktör ise çiftleşmedir. Esasen çiftleşmemiş ve çiftleşen kenelerin tükürük içeriğindeki moleküllerin çeşitliliği birkaç istisna dışında pek değişmez; ancak, total protein miktarı çiftleşenlerde belirgin derecede daha fazladır (McSwain ve ark. 1982). Bu noktada, çiftleşme sırasında erkekten dişiye aktarılan bazı faktörlerin rol aldığı bildirilmiştir (Sonenshine 1991).

Kene tükürük salgısının kimyasal içeriği irdelendiğinde, yapıların önemli bir kısmının, bir şekilde beslenme sürecinde iş gören ve çoğunluğu beslenme döneminde aktive olan tükürük bezi hücrelerindeki spesifik gen bölgelerince eksprese edilen, biyoaktif protein ve non-peptik maddelerden oluştuğu görülmüştür. Yine, su ve bazı elektrolitler de sürece katılırlar. Öte yandan, normalde kene hücreleri içinde bulunan ve normal metabolik sürece dahil olan maddelere de rastlanır. Bunların, deforme olan hücrelerden ortama yayılmış olması ihtimali vardır. Ancak, ilgili moleküllerden bazılarının, farklı proseslerle (eksozom sekresyonu) hücre dışına, oradanda tükürüğe verildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Díaz-Martín ve ark. 2013). Ayrıca, kene tükürük salgısında, konağa ait pek çok moleküle de rastlanır (Valenzuela

ve ark. 2002); hemoglobin, albumin, immunoglobulin, kompliment sistemi proteinleri, antimikrobal proteinler, peroksiredoksin, serotransferrin, apolipoprotein, hemopeksin, proteinaz inhibitörleri, heptoglobin, transferin, bir plazma serpini gibi konak kökenli maddeler bunlardan bazılarıdır. Bu maddeler, kan ile alınmakta, kene bağırsağından hemolenfe, oradan da tükürük bezine taşınmakta, takibinde de değişik proseslerle tükürüğe aktarılıp konak dokusuna geri pompalanmaktadır (Oliveira ve ark. 2013; Tirloni ve ark. 2015). Kenede, özellikle beslenme sürecinde, hemoglobin, immunoglobulin gibi molekülleri bağırsaktan alıp tükürük bezine taşıyan veya belli vakuollerde sekestre eden özel proteinler (hemolipoglikoproteinler, heme lipoprotein-HeLp vs.) üretilmektedir (Maya-Monteiro ve ark. 2000; Dupejova ve ark. 2011). Söz konusu konak kaynaklı maddelerin konağa geri verilmesi, emilen kanın konsantrasyonunda iş görmektedir (Francischetti 2010); ancak, verilen birçok molekülün aynı formda geri iletilmediği, değişik modifikasyonlardan (glikolizasyon, bazı tükürük bileşenleriyle bağlanma vs.) geçirildiği ve bu modifiye yapıların da olasılıkla kenenin beslenme sürecinde önemli roller üstlendiği ileri sürülmüştür (Oliveira ve ark. 2013).

Tükürük salgısı, kenenin etkili bir şekilde kan emebilmesi için oldukça büyük önem taşır. Görece uzun beslenme sürecinde, tükürük salınımı ve kan emme, peş peşe birbirini takip eden pulzasyon tarzı (her siklus 5-20 dk sürer) bir seyir izler. Salgılamamanın söz konusu pulzasyonunun, kenenin kendisini konak immunitesinden kaçırmasına da yardımcı olduğu bildirilmiştir (Tu ve ark. 2005; Francischetti 2010). Kene beslenme sürecinde, konağın hemostasisi (kan kaybını önleme mekanizması), doku yangısı (ağrı ve kaşınmaya bağlı konak farkındalığını sağlar) ve bağışıklığı (hümmoral ve hücresele) ile mücadele etmek zorundadır. Konağın söz konusu savunmalarını betaraf etme sürecinde tükürük esastır. Tükürük, birçok biyoaktif protein, lipit ve bazı diğer elemanları içermektedir ki yapılan çalışmalarda 500'den fazla (Kingston ve ark. 2002; Kotsyfakis ve ark. 2007), çoğunlukla 6-130 kDa arasında büyüklüğe sahip protein çeşidine rastlanmıştır (Sonenshine 1993; Tu ve ark. 2005). Bunlardan bazılarının keneye özgü olduğu, birçoğunun ise görevi konusunda bilgi bulunmadığı kaydedilmiştir. Etkinliği bilinenler arasında; pıhtılaşma önleyiciler, kan pulcuğu baskılayıcılar, vasodilatörler, yangı önleyiciler ve immunomodulatörler bulunmaktadır (Francischetti 2010). Söz konusu yapılar, dokuda meydana getirdikleri immunomodulasyondan dolayı, kenenin taşıdığı olası etkenlerin konağa kolaylıkla girip yerleşebilmesine de yardımcı olmaktadır (Kazimírová ve Štibrániová 2013; Wikel 2013).

Kene tükürük salgısında bulunan başlıca yapılar şunlardır: Glisin veya prolinden zengin, kollagen benzeri protein süperailisi, müsinler, antijen 5 protein ailesi, kan pulcuğu aktivitesini engelleyiciler (sisteinden zengin, ixodegrin süperailisine ait *Ixodes* spp.'de RGD, *D. variabilis*'te variabilin, *O. savigny*'de savignygrin gibi), ixostatin (*Ixodes* spp.'de), lipokolinler (histamin ve seretonin bağlayıcı, komplament baskılayıcı, antikor bağlayıcı veya toksik etkinlikte), 8,9-kDa, 12-kDa, 13-kDa, 16-kDa, 23-kDa polipeptit aileleri, sitotoksin benzeri aile, PGFG tekrar ailesi, IS4 ailesi, prostriat spesifik aile (*I. scapularis* ve *I. ricinus*'ta; bazıları komplament baskılıyor), argasid spesifik aile, salgılanan korunmuş proteinler, metastriat spesifik proteinler (immunsüpresif karakterde Da-p36, *R. sanguineus*'ta kemokin bağlayıcı evasin, hormon benzeri maddeler, fibronektin, endostatin, insulin growth-factor bağlayıcı aile, Kazal ailesi, *R. microplus*'ta omurgasız nöropeptidi karakterindeki orcokinin, *A. variegatum*'da insülin prekrüsörü, *R. appendiculatus*'ta adipokinetik hormon benzeri madde, *R. microplus*'ta korunmuş büyüme faktörlerinden olan granulinler, *O. parkeri*'de olasılıkla konaktan köken alan, vasodilatör, anjigenik ve immunomodülatör karakterdeki adrenomedulin, *A. americanum*'da bir çeşit anti-anjiogenik faktör vs.), proteaz inhibitör ailesi, kene immunitesi ile ilişkili yapılar, enzimler ve non-peptik komponentler (Francischetti 2010), hidrojen peroksitin indirgenmesini sağlayarak antioksidan özellik gösteren protein (*I. scapularis*'te) (Das ve ark. 2001).

Kene tükürüğünde, kenenin bizzat kendi immunitesi ile ilişkili olduğu veya olabileceği düşünülen birçok yapı keşfedilmiştir. Bunların başlıcaları, antimikrobial etkinlik gösteren secropinler, lizozim, defensin, patojenin tanımlanma ve mücadelesi sürecinde rol alan moleküller (lektinler, olasılıkla fenol oksidaz aktive edici sisteminin bir parçası olan serin proteazlar), 5.3-kDa ailesi, Y-rich GR peptid ailesi, thioester/alpha2 makroglobulin ailesidir. Antimikrobial etkinlik gösteren etmenlerden olan mikropulsin ve diğer histidinden zengin protein ailesinin (mikropulsin, croplusin, hebreain, nötrofil elastaz inhibitörü gibi) birçok farklı rolünün olduğu görülmüştür. Histidinden zengin olan mikropulsin ve habrein grubu, mikroorganizmaların gelişimi açısından önemli bir faktör olan demiri bağlayarak antimikrobial etkinlik göstermektedirler (Francischetti 2010).

Kene tükürük salgısında, beslenme sürecinde büyük önem taşıyan çok sayıda enzim bulunur. Apiraz (yıkılanan doku hücrelerinden salınan, takibinde de kan pulcuğu ve nötrofili aktive eden ATP ve ADP'yi hidrolize ederek ortadan kaldırır), esteraz, glukosidaz, kininaz, fosfolipaz A2, anafilatoksin inhibe edici enzim ve metalloproteaz (fibrin ve fibrinojene

afinitelidir) bunlardan başlıcalarıdır. Çalışmalarda, 110 metalloproteaz, 34 tripsin benzeri serin proteaz, 13 serin karboksipeptidaz, 2 prolyl karboksipeptidaz, 20 karboksi esteraz, 20 kitinaz, 7 lipaz, 7 fosfolipaz A2, 8 sfingomyelinaz, 1 leukotrin hidrolaz, 14 5'nükleotidaz/apiraz, 1 ektonükleotid pyrofosfataz/fosfodiesteraz, 2 multipli inositol fosfataz, 9 dipeptidyl peptidaz (kininase), 3 alkalın fosfataz, 4 ribonükleaz, 1 epoksi hidrolaz, 1 pirofosfataz ve 8 endonükleaz saptanmıştır. Fakat bunlardan tamamının doğal salgılama sürecinde tükürüğe geçip geçmediği konusu tartışmalıdır. Tükürük elde edilmesi sürecinde uygulanan yöntemler ile ilişkili olarak, bazı artifaktların ortaya çıkabileceği de bildirilmiştir (Francischetti 2010).

Kene tükürüğünde birçok proteaz inhibitörü de keşfedilmiştir. Bunlarda başlıcaları; Kunitz domain içeren aile (Rhipilin-2, savignin, Ixolaris, boophilin, pentalaris, ornithodorin vs; Xase ve prothrombinase gibi S1 ailesi enzimleri baskılarlar), serpin domain ailesi (serin protez inhibitörleri; IRIS vs.), systatinler (I. *scapularis*'te saptanan sialostatin L, sialostatin L2 vs.; sistein proteaz inhibitörüdürler, yangı giderici ve immünsüpresif etkinlikleri vardır; fibroblastların doku degradasyonunda ve antijen sunan hücrelerin intraselüler protein işlemleri sürecinde rol alan katepsin L ve S'yi baskılarlar), tyropin ailesi (sistein proteazı ve heparinin bağlanmasında yardımcı olan kimi faktörleri baskılarlar), tripsin inhibitör benzeri grup (antitripsin, antielestaz ve antimikrobial etkinlikli ixodidin vs.), hüridin benzeri/madanin/variegin ailesi (antitrombin özellik taşırlar), basit kuyruk ve 18.3-kDa süperailesi (kan pulcuğu agregasyonunu önleyicidirler), karboksipeptidaz inhibitörleri (olasılıkla plazma karboksipeptidaz N ve B'yi inhibe ederek fibrinolizisi baskılarlar) (Arolas ve ark. 2005; Fogaca ve ark. 2005; Tu ve ark. 2005; Kotsyfakis ve ark. 2007; Francischetti 2010; Cao ve ark. 2013).

Kene tükürüğünde bulunan nonpeptik elemanlardan başlıcaları ise şunlardır: Bioaktif lipidik komponentler PGF2alfa ve PGE2 (dentritik hücreleri baskılar), cannabinoidler (olasılıkla analjezik ve antienflamatuar etkili) ve lipoksinler (olasılıkla antienflamatuardır) (Francischetti 2010). *B. microplus*'ta düz kas kontraksiyonunu uyaran prostoglandinler, *A. americanum*'da rat kolon ve mide kasları üzerine kontraktif etki gösteren PE2, PGF2 ve bunlara ek olarak araşidonik asit tespit edilmiştir. Bunlardan PGE2'nin, tükürük bezi epiteli plazma membranındaki özel reseptörlerine tutunarak Ca²⁺ mobilizasyonunu uyardığı ve böylece bioaktif protein salınımına yardımcı olduğu, bu yönü ile kene tükürük bezinde rol alan önemli bir otokrin olduğu anlaşılmıştır (Tu ve ark. 2005).

Keneler, tutundukları bölgede lokal olarak ve sistemik düzeyde konağın immun sistemini modüle eder. Esasen tükürükte bulunan bazı maddeler immünsüpresif etkinlik gösterse de, asal etkinliği, bağışıklık sistemini bypass etmeye yönelik immunomodulasyondur. Bu noktada keratinositleri, dentritik hücreleri, NK hücrelerini, T hücrelerini (Th1, Th2, Th17, Treg), B hücrelerini, nötrofil, bazofili, mast hücrelerini, endotel hücrelerini, sitokinleri, kemokinleri, komplementleri ve ekstraselüler matriksi etkileyebilmektedirler. NK hücrelerinde aktivite yitimine, nötrofillerde endotele ve diğer lökositlere tutunmayı sağlayan ligant üretimini baskırlar ki bu durum yara bölgesine hücreyel infiltrasyonu baskırlar. Yine, bu hücrelerde fagositozu, süperoksit aracılı öldürücülüğü baskırlar; birçok kene ortama nötrofil çeken IL8'i ve diğer kemokinleri baskırlamaktadır. Vücutta gelişecek immunolojik yanıtın yönlendirilmesi noktasında büyük önem taşıyan derideki Langerhans hücrelerini modüle eder ki bu noktada tükürükteki PGE2'nin rolü büyüktür (Wikel 2013); ancak, hücre üzerinde herhangi bir toksik etki göstermez (Carvalho-Costa ve ark. 2015). Tükürük salgısı makrofajda CD86 etkinliğini arttırmakta ve bazı diğer yolakaları da kullanarak (ilgili sitokinleri düzenleyerek) CD4 T hücre polarizasyonunu Th1 yerine Th2 yönünde modüle etmektedir (Brake ve ark. 2010). *I. scapularis* tükürüğünde bulunan ve sistein proteaz inhibitörü bir protein olan "sialostatin L2"nin, farelerden elde edilen dentritik hücrelerde IFN- β yanıtını baskırladığı görülmüştür ki adı geçen interferon grubu, kene tarafından aktarılan hastalık etkenlerine karşı konak bağışıklığının oluşturulmasında asal bir rol üstlenmektedir (Lieskovska ve ark. 2015). Yapılan bir hücre kültürü denemesinde, besiyerine katılan 64 $\mu\text{g/ml}$ yoğunluğundaki kene tükürük salgısının, değişik T hücre tiplerinde proliferasyonu %69-83 oranında azalttığı, ancak, antijen sunumlarını etkilemediği görülmüştür. Ayrıca, kene tükürüğünün dalak hücrelerinde, IL-10 üretimini arttırdığı, IFN- γ 'yı ciddi oranda baskırladığı, benzer sitokin manuplasyonlarını kullanarak makrofajlarda nitrik oksit üretimini azalttığı öne sürülmüştür (Ferreira ve Silva 1998; Hannier ve ark. 2003). Yine, *I. ricinus* tükürüğünde bulunan ve konakta CD4⁺ T hücrelerini baskırlayan Salp15 isimli proteinin tükürükteki oranının, *Borrelia burgdorferi* ile enfekte kenelerde çok daha yüksek düzeyde bulunduğı, bakterinin bir şekilde tükürük bez hücrelerinde ilgili proteinin üretimini aktive ettiğı görülmüştür. Söz konusu protein, bakteri yüzeyindeki bir proteini (OspC) etkileyerek, konakta oluşan spesifik antikorların bakteriye tutunmasını engellediğı anlaşılmıştır (Ramamoorthi ve ark. 2005).

2.1.3. Kene tükürüğünün klinik kullanım potansiyeli

Kene tükürük salgısında 200'ün üzerinde biyoaktif molekül tespit edilmiştir. Bunlardan bir kısmının işlevleri açıklanabilmişse de, klinik boyuttaki kullanılabilirliklerine yönelik çalışmalar çok azdır (Maritz-Olivier ve ark. 2007). Diğer yandan, kene tükürüğünde bulunan birçok maddenin, sahip olduğu immunomodulator, antiinflamatuvar, antiplatelet ve pıhtı giderici özelliklerinin olduğu, ayrıca çeşitli hücre tiplerine gösterdiği sitotoksik, apoptotik etkinlik ve anti-anjiogenetik özelliklerinden dolayı çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği öne sürülmüştür. Bu noktada, etken maddenin terapötik etkinliğinin kenenin türüne, beslenme dönemine ve hedeflenen hücre veya hastalık tipine bağlı olarak değişebildiği de ifade edilmiştir (Sousa ve ark. 2015).

Antikoagulan etkinlikli tükürük bileşenleri üzerine yapılan çalışmalarda, *Ornithodoros moubata*'dan elde edilen ve faktör Xa'yı baskılayarak iş gören "rekombinant protein TAP (RTAP)", değişik hayvan modellerindeki arteriel ve venöz trombozislerde heparin ile karşılıklı olarak denenmiştir. Denemeler RTAP'ın çözüm konusunda oldukça etkili olduğunu, çözüm getiren dozlarda herhangi bir kanama zamanı uzamasına yol açmadığını, aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (APTT) değeri noktasında ise, sadece yüksek dozlarda kısmi sorunlar yaratabildiği, ama bu konuda heparine göre çok daha güvenilir olduğu görülmüştür (Fioravanti ve ark. 1993). Adı geçen yan etkisiz antikoagulan etkinliği, yapılan diğer çalışmalarla da desteklenmiştir (Stoll ve ark. 2007).

Antitümöral etkinliğin belirlenmesi konusunda, farklı kene türlerine ait tükürük salgısı, tükürük bezi ekstraktı veya tükürükten izole edilen spesifik moleküller değişik tipte kanser hücreleri üzerinde denenmiştir. İlgili çalışmalarda, farklı uygulamaların antianjiogenetik, apoptotik, sitotoksik, antimetastatik veya antimitotik özelliklerini ortaya konmuştur (Carvalho-Costa ve ark. 2015; Sousa ve ark. 2015).

Tükürük salgısı anjiogenezisi en az iki yoldan baskılayabilmektedir. Bunlardan birincisi, endotel hücrelerinin integrin fonksiyonunu bloke etmektir ki bu hücreyi apoptozise götürmektedir. İkincisi ise anjiogenezisin geliştiği hazırlık matrisinin degradasyonudur (Francischetti 2010). Anjiogenezin baskılanması, iki şekilde sonuç doğurmaktadır; bunlar, hem tümör büyümesini engellemek, hem de metastaz şansını azaltmaktır (Fukumoto ve ark. 2006; Decrem ve ark. 2008). *I. scapularis* ve *B. microplus* tükürüğü ve tükürük bezi ekstraksiyonunun mikrovasküler endotel hücrelerinin üremesini, apoptozisi uyararak baskıladığı görülmüştür (Francischetti ve ark. 2005). *Haemaphysalis longicornis*'ten elde edilen "HLTnI (troponin I benzeri protein)" (Fukumoto ve ark. 2006) ve "haemangin" adında bir maddenin endotel

hücrelerinde proliferasyonu baskılayıp apoptozisi uyararak angiogenezi engellediği ve ayrıca, memeli hücreleri için herhangi bir toksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür (Islam ve ark. 2009). *Amblyomma cajennense*'den elde edilen Amblyomin-X'in (serin proteaz Kunitz-tip inhibitör) vasküler büyüme faktörü A (VEGF-A)'yı inhibe ederek, farelerde subkutan angiogenezi ve tavuk emriyo koriallontoik memran angienezini baskıladığı ortaya konmuştur. *In vitro* denemelerde ise, t-End hücrelerine (polyoma middle T oncogene-transformed cell- fare timusundan elde edilmiş endothelioma hücreleri) Amblyomin-X uygulanmış, sonuçta G0/G1 fazı uzamış, hücre siklusu gecikmiş, hücre üremesi ve adezyon yetisi baskılanmıştır (Drewes ve ark. 2012). Yine, *D. reticulatus* ve *I. ricinus* tükürük bezi ekstraktının da, hücrede büyüme faktörlerine bağlanarak hücre proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Hajnická ve ark. 2011).

Ixodes scapularis tükürük bezinden izole edilen "Ixolaris" adında bir proteinin anti-angiogenetik etkisi olduğu bildirilmiştir (Francischetti ve ark. 2002; Fukumato ve ark. 2006). Yapılan bir çalışmada, 6 haftalık, erkek, çıplak bir Balb/c ırkı farenin göğüs bölgesinin yan tarafında, derialtı olarak primer beyin glioblastom hücreleri (U87-MG) inokule edilmiş ve oluşturulan tümör dokusu 17 gün boyunca Ixolaris verilerek tedavi edilmeye çalışılmıştır. Bulgularda; tümör dokusunda angiogenезin baskılandığı, lokal pıhtılaşma süreçlerinin engellendiği ve sonuç olarak da tümör oluşumunun baskılandığı sonucuna ulaşılmıştır. Neticede, ilgili maddenin kanser hastalarındaki prekoagulan süreci engelleyebileceği ve angiogenezi baskılayabileceği gösterilmiştir (Carneiro-Lobo ve ark. 2009). Ixolarisin benzer etkileri fare melanom (B1610) modellerinde de görülmüştür. Maddenin, fare veya insan melanoma hücrelerinde FX alttiplerini baskıladığı, antitümör etkinliğini hem tümöre ait mikrovaskulasyonu, hem de vasküler endotelial büyüme faktörünü baskılayarak gösterdiği anlaşılmıştır (de Oliveira Ada ve ark. 2012). Sıçanlarda oluşturulan trombuslarda yapılan Ixolaris denemeleri, antitrombotik etkiyi ortaya koymuş ve plazma yarı ömrünün 34-40 saat kadar sürdüğü ve hastada herhangi bir beklenmedik kanama eğilimine yol açmadığı anlaşılmıştır (Maritz-Olivier ve ark. 2007). Yine, *A. americanum*'un tükürük salgısında tespit edilen ve endoplazmik retikulumdaki majör kalsiyum bağlayan protein olan "calretucilin" in, angiogenezi ve hücre adezyonunu baskılayabileceği düşünülmektedir (Sousa ve ark. 2015).

Amblyomma cajannense tükürüğünün pankreas adenokarsinomunu ve melanomayı etkilediği görülmüştür. Yapılan çalışmada, tükürüğün kanser hücrelerinde hücre döngüsünün her aşamasında sitotoksositeye neden olabileceği gösterilmiştir. İlgili etkinin (nekrozis); tümör

hücrelerinde form değişikliği (yuvarlaklaşma) ve DNA degradasyonu olarak izlenebildiği bildirilmiştir. Öte yandan, benzer toksik etki, tümör davranışı göstermeyen normal hücrelerde ve kontrol olarak kullanılan fibroblastlarda izlenmemiştir (Simons ve ark. 2011).

Fare melanom modellerinde yapılan çalışmalar, Amblyomin-X uygulamalarının tümörde degradasyonu sağladığı ve metastazı farklı derecelerde baskılayabildiği görülmüştür. Bu maddenin, olasılıkla, tümör hücrelerinde apoptozisi uyaran ubiquitin-proteozom sistemi üzerinden çalıştığı düşünülmektedir (Chudzinski-Tavassi ve ark. 2010). Amblyomin-X'in, renal hücre karsinomasına ait hücre hatlarında (Renca), uygulama dozu ile ilişkili olarak apoptozisi uyardığı görülmüştür (Akagi ve ark. 2012). Değişik kene türlerinden elde edilen tükürük salgılarıyla HeLa hücre hatlarında da, uygulanan doza göre, hücre döngüsünde herhangi bir değişikliğe yol açmayarak apoptozis uyarılabilmektedir. Çalışmada, söz konusu etkinin kenenin türüne göre değiştiği, en başarılı sonuçların *R. appendiculatus* ve *A. variegatum*'dan elde edildiği bildirilmiştir (Kazimirova ve ark. 2007).

Ixolaris üzerinden yapılan bir başka çalışmada, TF-VIIa-PAR2 sinyal yolağı üzerinden çalışan meme kanseri modellerinde, ilgili sinyal trafiğini baskılayarak etkilediği bildirilmiştir (Carneiro-Lobo ve ark. 2012). Yine, *D. variabilis* tükürüğünün Saos-2 osteosarkom ve MB-231 meme kanseri hücre kültürüne uygulandığında, hücrelerde göçü ve invazyonu baskıladığı görülmüştür (Poole ve ark. 2013).

Bunlarla birlikte kene tükürük salgısı üzerinde yapılan araştırmalarda hücre dışı yolları olan ERK1/2 ve MAPK'leri inhibe ettiklerini gösteren hücresel düzeyinde çalışmalar da yapılmıştır (Ferreira ve Silva 2010).

2.1.4. Kene tükürük ve tükürük bezinin eldesi, analizi ve kullanım alanları

Tükürük salgısının içeriği kenenin türü, cinsiyeti, doyma dercesi ve uygulanan yöntem gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişir. Yapılan çalışmalarda, her bir keneden elde edilen tükürük salgısı ve protein içeriği ile ilgili elde edilmiş sonuçlar şu şekildedir: *I. scapularis* 2,5-20 µl (Ewing ve ark. 1994; Valenzuela ve ark. 2000; Patton ve ark. 2012), *B. microplus* 1 µl (Ciprandi ve ark. 2006) ve protein konsantrasyonu 1,75-3,22 µg/µl (Tirloni ve ark. 2014), *O. moubata* 44 µg tükürük proteini (1,14 µg/µl tükürükteki konsantrasyonu) (Díaz-Martín ve ark. 2013), *R. sanguineus* salgısında 970 µg/ml protein içeriği (Oliveira ve ark. 2011), *A. cajannense* 10-20 µl (366 µg/ml protein içeriği) (Carvalho-Costa ve ark. 2015) ve *R. microplus* kısmi

doymuşları 0,1 µl (3,22 µg/µL protein içeriği), tam doymuşları 0,8 µL (1,75 µg/µL protein içeriği) (Tirloni ve ark. 2014), *D. variabilis* 4 µl bulunmaktadır (Kramer ve ark. 2011).

Kene tükürüğü ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, tükürükte belirlenen spesifik proteinlerin rekombinat formundan (Carneiro-Lobo ve ark. 2009; Drewes ve ark. 2012; Francischetti ve ark. 2005), tükürük bezi ekstraktından (Valenzuela ve ark. 2000; Hannier ve ark. 2003; Kazimirova ve ark. 2007; Decrem ve ark. 2008; Brake ve ark. 2010; Hajnická ve ark. 2011; Mudenda ve ark. 2014) veya laboratuvar koşullarında elde edilen tükürük salgısından yararlanılabilmektedir. Tükürük materyali normal hücre hatlarında (dentritik hücreler, makrofaj, T hücreleri vs.) reseptör duyarlılığı, sinyal iletimi, sitokin etkinliği, göç yetisi, adezyon yetisi gibi özelliklere olan etkisini ölçmek, sitotoksosite ve/veya apoptozisi indükleme gücünü ortaya koymak, kanser hücre hatlarında toksisite, apoptozis, adezyon, göç, proliferasyon yetilerine olan etkileri araştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu amaç için, genellikle tükürük salgısı değişik konsantrasyonlarda (0,1-25 µg/ml, 0,01-0,25µl/ml, 1/10-1/1000 v/v vs.) kültür besiyerine katılabilmekte veya hücreler, kültür öncesi tükürük ile muamele edilebilmektedir (Gillespie ve ark. 2001; Sá-Nunes ve ark. 2007; Kramer ve ark. 2011; Simons ve ark. 2011; Poole ve ark. 2013; Carvalho-Costa ve ark. 2015). Bunların yanısıra, kene tükürüğü deney hayvanlarına veya embriyolu tavuk yumurtasına olan fizyolojik, patolojik etkisini veya in vivo ortamda oluşturulan deneysel tümör dokusuna olan etkisini (apoptozis, nekroz, adezyon, göç, proliferasyon, anjiogenez üzerine etkinliği vs.) gözlemlemek amacıyla enjeksiyon tarzında vs. uygulanabilmektedir (Francischetti ve ark. 2005; Skallová ve ark. 2008; Carneiro-Lobo ve ark. 2009; Chudzinski-Tavassi ve ark. 2010).

Kene tükürüğü ile yapılan çalışmalarda, kullanılan tükürüğün hacim olarak miktarı kriter kabul edilebilmektedir. Ancak, birçok çalışmada, sonuçların daha kontrollü olması adına, tükürüğün protein içeriği saptanmış ve denemelerde kullanılan miktarın içerdiği protein miktarı da kayıtlara geçirilmiştir. Tükürük analizi amacıyla değişik yöntemlerden yararlanılabilmektedir. Bunlardan bazıları şunlardır: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, nano RPLC-MS/MS (nanoflow reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry), 1D-LC-MS/MS (1D gel electrophoresis - liquid chromatography and tandem mass spectrometry), Qubitfluorometre analizi, Bradford metodu (Bio-Rad Protein Assay), moleküler sieving (280 nm absorbans), Microcon Filtrasyon yöntemi, BCA Protein Assay (the bicinchoninic acid method), NanoDrop 2000 spektrofotometre (Valenzuela ve ark. 2002;

Skalova' ve ark. 2008; Kramer ve ark. 2011; Oliveira ve ark. 2011; Díaz-Martín ve ark. 2013; Oliveira ve ark. 2013; Poole ve ark. 2013; Tirloni ve ark. 2014; Carvalho-Costa ve ark. 2015).

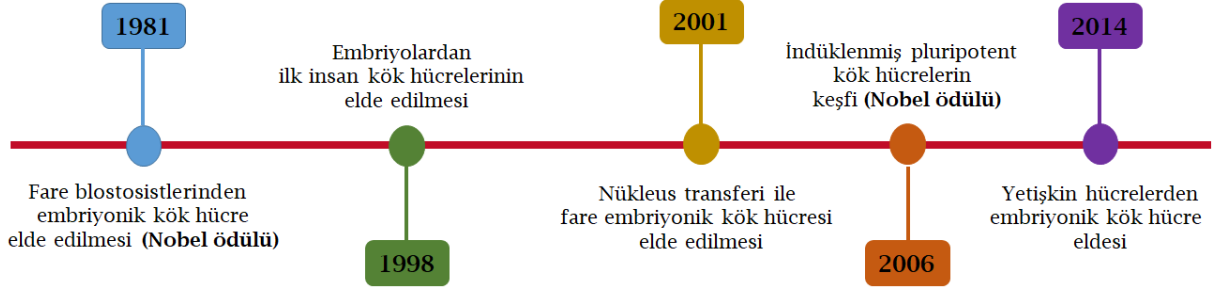
2.2. Kök Hücre

Kök hücreler, işlevsel olarak farklılaşmamış ve diğer hücre gruplarına dönüşme potansiyeli olan, kendini yenileme özelliğinde hücrelerdir. Vücut ve laboratuvar ortamlarında, uygun sinyaller aldıklarında, diğer özelleşmiş hücre tipine dönüşebilme yetisindedirler (Güneş 2005; Kansu 2006; Baran ve ark. 2007; Ural 2008). Diğer bir ifadeyle kök hücreler, farklılaşmadan bölünen ve kan, karaciğer ve kas gibi özelleşmiş, görev yapan organ ve dokuları oluşturan, farklılaşma yeteneğinde olan primitif nitelikteki hücrelerdir (Moore ve ark. 1997; Beksaç ve ark. 2004; Kansu 2006; Baran ve ark. 2007).

2.1.1. Kök hücre tarihçesi

Hücrelerin organizmanın yapı taşı olduğu ve bazı hücrelerin diğer hücreleri üretme kabiliyetine sahip olduğu 1800'lü yılların ortalarına doğru keşfedilmiştir. Kanada'lı bilimadamları Ernest A. McCulloch ve James E. Till 1960'larda hematopoetik kök hücre keşfi ile ilgili çalışmalar başlamış, bunu stromal kök hücrelerin (mezenkimal hücreler) bulunması takip etmiştir. Bilim adamları 1990'lı yıllarda memeli beyinde, sinir kök hücrelerini tespit etmişlerdir. Embriyonik kök hücreler ilk kez birbirinden bağımsız iki çalışma grubu tarafından, Evans ve Kaufman (Evans ve Kaufman 1981) ile Martin (Martin 1981), 1981 yılında, 3,5 günlük fare blastosistleri iç hücre kitlesinden elde edilmiştir (Evans ve Kaufman 1981; Graves ve Moreadith 1993). Daha sonraki yıllarda ise epidermis, karaciğer ve diğer birçok organlarda kök hücrelerin varlığı, bilimsel olarak kanıtlanmıştır. Thompson ve arkadaşları 1998'de, in vitro ortamda döllenmiş embriyo iç hücre kitlesini izole etmiş, ilgili kök hücre hattını geliştirmiş ve dondurmayı başarmıştır. Somatik nükleus transferi yapılan fare embriyolarından 2001 yılında kök hücre elde edilmiştir. Takahashi ve Yamanaka 2006 yılında başlattıkları araştırmalarda, somatik nükleus transferi deneylerinden yola çıkarak, pluripotent özellikle ilişkili faktörleri bulmuşlardır. Bu faktörlerin, yetişkin (farklılaşmış) hücre tiplerinin yeniden programlanmasında kullanılabileceğini, fare fibroblastlarında yaptıkları deneylerle göstermişlerdir. Söz konusu çalışmada, fare yetişkin fibroblastlarına tekrar embriyonik özellik kazandırılmıştır (Takahashi ve Yamanaka 2006). Günümüzde bilinen üç temel kök hücre kaynağı yetişkin kök hücreleri, kordon kanından elde edilen kök hücreler ve embriyonik kök hücrelerdir (Nichols ve ark. 2001; Kansu 2006) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kök hücre çalışmalarından bazılarının yıllara göre dağılımı (Piskorska-Jasiulewicz and Witkowska-Zimny 2015).



2.1.2. Kök hücre tanımı ve özellikleri

Kök hücreler, preimplantasyon öncesi blastosistin iç hücre kitlesinden izole edilen pluripotent hücrelerdir. Bu hücreler, henüz farklılaşmamış hücreler olup, kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. *In vitro* ve *in vivo* ortamlarda, kaynaklandıkları dokuların hücrelerine farklılaşabildikleri gibi, farklı özelleşmiş doku hücrelerine de dönüşebilme potansiyeline sahiptirler (Kansu 2006; Ural 2008). Kök hücre, “fonksiyonel olarak farklılaşmamış ve heterojen üreme potansiyeli olan hücre” olarak tanımlanabilmektedir. Başka bir tanıma göre kök hücre; “bölünerek kendini yenileyen, sayılarını devamlı sabit tutan, kan, karaciğer ve kas gibi özelleşmiş, görev yapan organları oluşturan ve farklılaşma yeteneğinde olan ilkel nitelikteki hücredir” (Evans ve Evans ve Kaufman 1981; Martin 1981; Moore ve ark. 1997; Nichols ve ark. 2001).

Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlayabilmek için 4 ölçüt söz konusudur (Verfaillie ve ark. 2002). Bunlar;

1. Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Hücrelerin uzun süre bölünebilmelerini belirleyen faktörlerden biri, kromozomların ucunda bulunan telomer adı verilen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileridir (TTAGGG). Telomerler kromozom uçlarının parçalanmasını, diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır (Harley 1991).

2. Kök hücreler, özelleşmemiş hücelere kaynaklık edebilir ve birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bunun iyi bir örneği, döllenmiş yumurta hücresinde görülebilmektedir.

3. Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilmektedir. Konu ile ilgili örnek kök hücreleri hematopoietik kök hücrelerde, karaciğer öncüllerinde ve sinir kök hücrelerinde gösterilmiştir.

4. Kök hücreler, *in vivo* şartlarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış hücre hatlarına katkı sağlayabilmektedirler. Buna en iyi örnek, embriyonik veya erişkin kök hücrelerinin (nöral, mezenkimal), blastosiste enjekte edilmeleri durumunda farklı hücre tiplerine kaynaklık edebilmeleridir (Verfaillie ve ark. 2002).

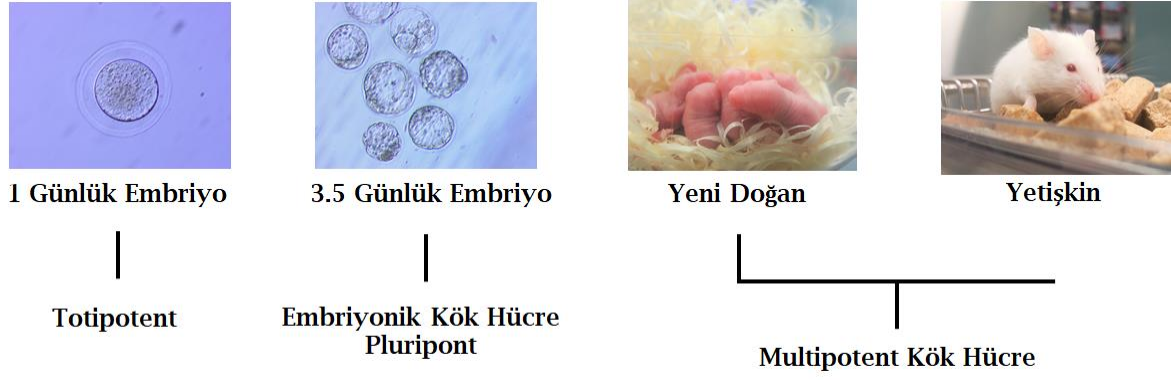
2.1.3. Kök hücre tipleri

Kök hücreler farklılaşma özelliklerine göre, üç tipe ayrılırlar; totipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve multipotent kök hücrelerdir (Şekil 2.1). Erken embriyonik dönemdeki kök hücrelerinin bölünme kapasiteleri oldukça yüksektir. Bu hücreler aynı bölünme potansiyelini kendinden sonra gelen hücelere de aktarabilir ki gelen yeni nesil hücrelerin de bölünme kapasiteleri oldukça yüksektir. Gelişimin daha geç evresindeki hücrelerde ise bölünme potansiyeli azalmaya başlar ve dolayısıyla da çoğalma kapasiteleri gittikçe zayıflar. Çoğalma kapasitesi zayıflarken, söz konusu sonraki nesil hücrelerde çoğalma asimetric olarak gerçekleşir (Moore ve ark. 1997).

Totipotent Kök Hücreler: Bu hücreler; embriyo, embriyo sonrası bütün doku ve organlar ile embriyo dışı membranları ve organları veren, sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir. Erken embriyonik dönemde 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotenttirler (Moore ve ark. 1997; Moore ve ark. 1997; Beksaç ve ark. 2004; Kansu 2006; Ural 2008).

Zigot da bir totipotent hücredir. İnsan gelişimi, spermin yumurtayı döllemesiyle oluşan zigottan meydana gelir. Zigottan oluşan blastomer yapı da totipotent özelliğe sahiptir. Bu hücreler, ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere 3 embriyolojik tabakayı meydana getirmektedirler (Asch ve ark. 1995).

Bazı organizmalarda, hücreler tekrardan geri başkalaşım göstererek totipotensi özelliklerini geri kazanabilmektedirler (Mitalipov ve Wolf 2009).



Şekil 2.1. Kök hücre çeşitleri

Pluripotent Kök Hücreler: Hücre biyolojisinde, pluripotensi (Latince kökenli bir kelime plurimus, pek çok, potens, güce sahip) organizmada birçok doku ve organın oluşmasına kaynaklık eden bir durumdur (Binder ve ark. 2009). Embriyoda blastosistin iç hücre kitlesindeki hücreler (embriyoblastlar), endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan hücre çeşitlerine farklılaşabilmektedir. Fakat totipotent özelliğe sahip olmadıkları için, organizmanın embriyosunu ve embriyo sonrası bütün dokularını meydana getiremezler. Embriyonik kök hücreler blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilmekte olup pluripotent özellik taşımaktadırlar (Graves ve Moreadith 1993). Embriyonik kök hücreler yüksek seviyede telomeraz aktivitesine sahiptirler; hücre replikasyonu bu etkinliklerinde azalmaya yol açmamaktadır. İlgili nedenden dolayı, sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptirler (Hemmati-Brivanlou ve ark. 1992; Moore ve ark. 1997; Moore ve ark. 1997; Beksaç ve ark. 2004; Kansu 2006; Ural 2008).

Multipotent Kök Hücreler: Multipotansiyel kök hücre ve bu hücrelerin bölünmesi sonucu oluşan ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış olan hücreler bu gruba dahildir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetal dönem), hücreler biraz daha özel görevlere sahip olurlar ve erişkin kök hücrelere dönüşürler. Bu erişkin kök hücreler tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Bu noktada verilebilecek en iyi örnek kemik iliği kök hücreleridir. Multipotent hücreler, pluripotent kök hücrelerden farklı olarak, embriyonik tabakalardan meydana gelen tüm hücrelere farklılaşamazlar. Diğer bir ifadeyle özelleşme durumları biraz daha ileri seviyededir (Moore ve ark. 1997).

2.1.4. Kök hücre kullanım alanları

Kök hücre çalışmaları rejeneratif tıp alanında özel bir konuma sahiptir. Uzun süre bölünebilme, kendini yenileyebilme, in vitro koşullarda diğer doku hücrelerine dönüşebilme gibi özel yetilere sahip olan bu hücreler, sahip oldukları özellikler sayesinde doku yenileme,

otoimmün hastalıklarda tedavi amaçlı olarak, doku ve organ mühendisliğinde vs. kullanılabilirler (Martin 1981; Austin 2001). Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılabilirler olup kullanım alanları da ilgili potansiyellerine göredir (Kansu 2006; Czechanski ve ark. 2014).

Embriyonik kök hücrelerinin in vitro ortamda özgün hücre serilerine farklılaşmasına dayanan çalışmalar yapılmaktadır. Bu gözlemler sonucunda, bu hücrelerin yeni ilaçlar için gen hedeflerinin tanımlanmasında kullanılabileceği, gelişimsel biyolojide teratolojik ve toksik bileşiklerin tanımlanmasını sağlayacağı, gen tedavilerinde ve hücre temelli tedavilerde hücrelerin ve dokuların üretiminde kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Pek çok hastalığın tedavisinde kullanılabilecek ilaçların keşfi noktasında oldukça yararlı olabilecekleri öngörüsü yaygındır (Soria ve ark. 2000; Bjorklund ve ark. 2002).

Hücrelerin farklılaşması sürecinde, kanser ve doğum kusurları gibi ciddi sağlık problemleri ortaya çıkabilmektedir. Eğer hücre farklılaşmaları daha iyi anlaşılabilirse, hastalıklara yol açan sebepler ve bu sebeplerin giderilmesi konusunda çok önemli adımlar atılabileceği ifade edilmektedir. Yeni ilaçların geliştirilmesi safhasında, kök hücrelerden yola çıkılarak üretilen dokuların ilaçları test etmede kullanılabileceği belirtilmektedir. Örneğin; sinir sistemi ile ilgili bir ilacın denenmesi için beyin dokusuna dönüştürülmüş kök hücreleri ya da kalp hastalıkları ilaçlarını test için kalp kası dokusu üretilebilecektir. Organ, doku veya kan nakli çalışmalarında, kök hücrelerinin önemli bir kaynak olabileceği de düşünülmektedir (Baran ve ark. 2007).

Embriyonik kök hücrelerinin Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere ve Avustralya başta olmak üzere birçok ülkede deneysel aşamaları tamamlanmış olup, hayvan uygulamaları yapılmaktadır (Kansu 2006). Son 20 yıldır dünyada kabul gören şekliyle embriyonik kök hücreler; kemik iliği veya kandan elde edilen ve kan üretebilen hücrelerin naklinde, Akdeniz anemisinde, lösemi ve lenfoma gibi hastalıkların ve bazı kanser türlerinin tedavisinde başarılı bir şekilde uygulanabilmektedir (Beksaç ve ark. 2004; Kansu 2006). Embriyonik ve erişkin kök hücrelerinin sağlık bilimlerinde tedavi amacıyla, çok geniş uygulama alanlarına sahip olması beklentisi vardır. Totipotent yönlenme özelliklerine sahip embriyonik kök hücreleri, in vitro şartlarda üretilebilmekte ve farklılaşmaları kontrol altına alınabilmektedir. Embriyonik kök hücre dizileri, yapay kültür ortamlarında ve laboratuvar şartlarında çoğalabilmekte ve sınırsız olarak çoğaltılıp canlı olarak tutulabilmektedirler (Soria ve ark. 2000; Bjorklund ve ark. 2002; Sökmensüer 2007; Ural 2008). Yapılan çalışmalarda, uygun kültür şartlarında ve uyarılar

varlığında embriyonik kök hücrelerinin miyosit (kas hücresi), adiposit (yağ hücresi), kondrosit (kıkırdak hücresi), osteosit (kemik hücresi), kan hücreleri ve damar endotel hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir (Shamblott ve ark. 1998; Thomson ve ark. 1998). Adı geçen farklılaşmalar özgün biyolojik, immünolojik, biyokimyasal, elektro fizyolojik ve moleküler çalışmalarla test edilerek doğrulanmış durumdadır. Embriyonik kök hücrelerinin in vivo tedavi potansiyeli, bu hücrelerin ölümcül dozda radyasyon almış farelere enjeksiyonu takiben, kayıp kemik iliği kök hücrelerinin yeniden yapımını sağlamasıyla gösterilmiştir (Hollands 1987). Embriyonik kök hücre uygulamaları; başta kalp kası ve sinir hücresi gibi oldukça iyi farklılaşmış ve yaşamsal önemi fazla olan hücreleri de oluşturma gücüne sahiptir. Embriyonik kök hücreleri bu özelliklerine istinaden; alzheimer, parkinson, tip 1 diyabet, merkezi sinir sistemi hastalıkları, osteoartrit ve miyokart enfarktüsü gibi hastalıklarda tedaviye yönelik umut vaat ettikleri kaydedilmiştir. Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, embriyonik kök hücrelerden elde edilmiş nöron ve nöron öncü hücrelerinin, kardiyomyositlerin, mast hücrelerinin ve insülin salgılayan hücrelerin başarılı bir şekilde nakli gerçekleştirilmiştir. Bu hücrelerin alıcı organizmasında fonksiyonlarına devam ettikleri, yeni dokuda yaşadıkları ve bölgeye uyum sağladıkları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Soria ve ark. 2000; Kawasaki ve ark. 2000; Bjorklund ve ark. 2002).

Pluripotent kök hücreler temel tıp araştırmaları için çok değerli araçlar olmakla kalmayıp, uzun vadede hücre temelli tedaviler için de büyük umutlar vaat etmektedirler. Bu tip hücrelerin üzerinde en yaygın çalışılan grubu olan embriyonik kök hücreler tipik olarak *in vitro* dölleme yoluyla ortaya çıkan blastosistlerden türetilmektedirler. Embriyonik kök hücreleri partenogenez ve somatik hücre nükleus transferi (klonlama) gibi alternatif yöntemlerle de elde edilebilmektedir; öte yandan, bütün bu yöntemler insan uygulamaları için hem etik hem de pratik açıdan büyük sorunlar oluşturmaktadır. Uygulamakta olan yeniden programlama yöntemiyle yetişkin somatik hücrelerden de yararlanılmaya başlanmıştır. Pluripotensiyi kontrol eden genlerin özelleşmiş ergin hücreye dışarıdan aktarımı ve yüksek düzeydeki ifadesi sayesinde bu hücrelerin embriyonik kök hücrelere benzeyen hücre hatlarına dönüştürülebileceği görülmüştür (Takahashi ve Yamanaka 2006). Adı geçen hücrelere "indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPS)" denmektedir. iPS hücreleri değişik hastalıkları olan insanların somatik dokularından da üretilebileceği için, hastaya ve hastalığa özgü pluripotent kök hücre oluşturma potansiyelleri bulunmaktadır. Bu şekilde hem laboratuvar ortamında hastalık modellenmesi, hem de iPS hücrelerinin *in vitro* farklılaştırılması sonucunda hücre yenilenmesi tedavisi için, hastaya özgü (otolog) hücrelerin üretimi mümkün olabilecektir.

Orta vadede Parkinson hastalığı, omurilik yaralanmaları, dolaşım sistemi hastalıkları ve diyabet gibi pek çok hastalığın tedavisinde iPS hücrelerin kullanılabileceği öngörülmektedir (Önder ve Daley 2012).

2.1.5. Embriyonik kök hücre

Pluripotent kök hücre tipleri arasında yer alan embriyonik kök hücreler, canlı organizmada bulunan her çeşit hücre ve dokuya dönüşebilme kapasitesi nedeniyle, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında önemle üzerinde durulan bir gruptur (Güneş 2005; Kansu 2006; Baran ve ark. 2007). Embriyonik kök hücreler, implantasyon öncesi erken gelişim döneminde, blastosist aşamasına ulaşmış embriyolardan elde edilmektedirler. Bu aşamadaki bir embriyo iki farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Bunlardan dış kısımda bulunan ve trofektoderm adı verilen hücreler implantasyon sonrası plasenta yapısını oluşturmaktadırlar. İç kısımda bir kitle halinde bulunan iç hücre kitleciği (İHK) ise, fetal yapıyı oluşturmaktadır. Embriyonik kök hücreler; iç kısımdaki bu hücrelerin özel immünolojik ve mekanik yöntemler kullanılarak ayrıştırılması sonrasında, özel besi yeri ve büyüme faktörü içeren ortamlarda inkübasyonu ile elde edilmektedirler (Evans ve Kaufman 1981; Martin 1981). Pluripotent özellikteki embriyonik kök hücrelerin, uygun sinyallerle uyarıldıkları takdirde yaklaşık 200 farklı vücut hücresi çeşidine dönüşebileceği ifade edilmiştir (Baran ve ark. 2007).

Embriyonik kök hücreleri çok önemli iki özelliği sayesinde rejeneratif tıbbın odak noktası haline gelmiştir. Bunlar; kendini yenileme süreci ile farklılaşmaksızın proliferasyon olma becerisi ve farklılaşma için indüklendiklerinde özelleşmiş hücre türleri oluşturma potansiyelidir (Nichols ve ark. 2001; Türkşen 2006).

2.3. In Vitro Kültür Teknolojisi

Önemli bir kök hücre kaynağı olan embriyolardan elde edilen embriyonik kök hücrelerin kalitesi, farklı kültür besiyerlerinde gelişen blastosistlerin iç hücre kitleciğinin farklılaşmadan çoğalabilmesi ile bire bir ilişkilidir (Kansu 2006). Bu hücrelerle ilgili olarak, 1981 yılında yapılan çalışmalarda, fare blastosistleri iç hücre kitlesinden sürekli olarak farklılaşmadan çoğalan embriyonik kök hücreleri elde edilmiş (Evans ve Evans ve Kaufman 1981; Martin 1981), takip eden yıllarda da fare embriyonik kök hücre hatları oluşturulabilmiştir (Warren ve ark. 2010). Uygulanagelen mevcut yöntemlerde farklı kültür koşulları

kullanıldığında, gelişen blastosist kalitesine bağlı olarak, elde edilen EKH sayısının değiştiği bilinmektedir (Iijima ve ark. 2010).

Çoğu laboratuvarında kök hücrelerin çoğaltılması ve farklılaştırılması sürecinde eski kültür yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Embriyonik kök hücre çalışmalarında esas tutulan kritik nokta, hücrelerin farklılaşmadan gelişmeleri ve pluripotent özelliklerini kaybetmeden çoğalmalarının sağlanmasıdır. Fare embriyonik kök hücrelerinin ilk olarak elde edildiği dönemde, mitotik aktivitesi durdurulmuş fare fetal fibroblastları (FEF) ile zenginleştirilmiş besiyeri kullanılmıştı (Evans ve Evans ve Kaufman 1981; Martin 1981). Bu hücreler tarafından üretilen matris, kök hücrelerinin pleyte tutunabilmelerini, hayatta kalmalarını ve çoğalmalarını desteklemiştir (Meng ve ark. 2008). İlgili hücre kültürlerinde, esansiyel besin öğelerini ve amino asitleri içermesinden ötürü besiyeri sığır fetal serum (FBS) ile desteklenmektedir. Besiyerlerinde kullanılanılabilen bir diğer destek ise lösemi baskılayıcı faktördür (LIF) (Smith ve Medina 1988). LIF embriyonik kök hücrelerinin kendini yenileyebilmelerini ve pluripotent özelliklerinin devamlılığını desteklemektedir. Kök hücre kültüründe kullanılan besiyerlerinde, temel olarak bu üç bileşen esas alınarak hazırlanmaktadır (Smith 1991; Magin ve ark. 1992). Ancak, bu protokolda bazı eksikler söz konusudur. Örneğin, fare fetus fibroblastları (FEF) hala tam olarak tanımlanamamış olması ve hayvandan izole edilirken oluşabilecek kontaminasyonlara açık olması bunlardandır. Yine, FBS'nin EKH'ların gelişimini desteklediği, ancak EKH kalitesinin ve pluripotent özelliğinin azaldığı görülmüştür (Ying ve ark. 2003; Cheng ve ark. 2004).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Madde	Katalog No	Firma
Fosfatlı tuz tamponu (Phosphate Buffered Saline – PBS)	10010023	Gibco
Sığır jelatini (Gelatine From Bovine Skin)	G9391	Sigma
Knock Out Serum (Knock Out DMEM – KOSR)	10829018	Gibco
Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum - FBS)	SH3007103	Hyclone
Penisilin/Streptomisin (10,000 U/ml)	15140122	Gibco
L-Glutamin (200 mM)	25030081	Gibco
Esansiyel Olmayan Aminoasitler (non essential amino acids-mem naee)	11140050	Gibco
2-Merkaptoetanol (2-mercaptoethanol)	M6250	Sigma
Lösemi İnhibe Edici Faktör (Leukemia inhibitory factor-LIF)	23225	Santa Cruz
PD0325901	1213	Tocris
CHIR99021	4423	Tocris
BCA Kiti		Thermo
CTG Kiti (Luminescent Cell Viability Assay)	G7570	Promega
Fare embriyonik fibroblast (Balb/c x C57BL/6J' den elde edilerek mitomisin ile inaktive edilmiş KOÇ Ün. Deney Hayvanları hücre stoklarından temin edildi-FEF)		
Fare embriyonik kök hücre (Balb/c x C57BL/6J' den elde edilen kök hücreler KOÇ Ün. Deney Hayvanları-RF Hücre stoklarından temin edildi-fEKH)		

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler.

Cihaz	Kullanım Amacı	Marka ve Model
Flaster	Tavşan kulaklarına torba yapımı	RollFix
Pens	Kene diseksiyonu	Artifol-Ent / 1.0 mm
Makas	Kene diseksiyonu	Artifol-Ent / düz
Sterio mikroskop	Kene diseksiyonu	Labomed / CZM6
1,5 ml Mikrotüp	Tükürük salgısı stoklanması	Axygen / MCT150C
-80 Dolap	Tükürük salgısı stoklarının saklanması	Thermo / TS586
Homojenizatör	Tükürük bezlerinden, ekstrakt eldesi	Thermo / FP120
Spektrometre	Protein konsantrasyonu belirlenmesi	Mettler / UV7
Santrifüj	Protein konsantrasyonu belirlenmesi	Heraeus / Labafuge 400R
Steril Kabin	Hücre kültürü çalışmaları	Thermo / safe 2020
Aspiratör	Hücre kültürü çalışmaları	Vacuubrand / BVC control
İnkübatör	Hücre kültürü çalışmaları	Thermo / Steri Cycle
Sıcak su banyosu	Hücre kültürü çalışmaları	memmert
Sterio mikroskop	Hücre kültürü çalışmaları	Nikon / Eclipse TS100
Santrifüj	Hücre kültürü çalışmaları	Thermo / CL2
15 ml tüp	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / SCT15ML500
50 ml tüp	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / SCT50ML500

Serolojik pipet pipetörü	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / Motoped
5 ml serolojik pipet	Hücre kültürü çalışmaları	Costar / 4487

Çizelge 3.2. devamı.

Cihaz	Kullanım Amacı	Marka ve Model
10 ml serolojik pipet	Hücre kültürü çalışmaları	Costar / 4488
25 ml serolojik pipet	Hücre kültürü çalışmaları	Costar / 4489
50 ml serolojik pipet	Hücre kültürü çalışmaları	Costar / 4450
0,5 µl - 10 µl Otomatik pipet	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / AP-10
1 µl - 20 µl Otomatik pipet	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / AP-10ML
20 µl - 200 µl Otomatik pipet	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / AP-12-200
100 µl - 1000 µl Otomatik pipet	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / AP-1000
10 µl Pipet ucu	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / TF300
200 µl Pipet ucu	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / TF20-L-R-S
1000 µl Pipet ucu	Hücre kültürü çalışmaları	Axygen / TF1000
500 ml Filtre sistemi	Hücre kültürü çalışmaları	Corning / 430758
Enektör filtresi 0.22 µm	Hücre kültürü çalışmaları	Corning / 431229
Enektör filtresi 0.22 µm DMSO' e dayanıklı	Hücre kültürü çalışmaları	Corning /431224
Cryo Tüp 2 ml	Hücre kültürü çalışmaları	Corning / CLS430659

50 ml Enjektör Luer Lock ağızlı	Hücre kültürü çalışmaları	Hayat / 8696569000449
Tabak okuyucu	Hücre kültürü çalışmaları	BioTek / Synergy H1
Siyah 96 kuyucuklu petri kabı	Hücre kültürü çalışmaları	Corning / 4580

3.3. Çalışmada Kullanılan Keneler ve Üretimleri

Çalışma kapsamında üç kene türünden faydalanılmıştır. Bunlar *H. marginatum*, *R. bursa* ve *D. marginatus*'tur. Söz konusu keneler, Namık Kemal Üniversitesi Biyoloji Bölümüne ait, spesifik patojenlerden arı, devamlılıkları ergin Yeni Zellanda tavşanlarında (*Oryctolagus cuniculus*) beslenerek gerçekleştirilen (bütün gelişim aşamaları için aynı konak türünden yararlanılmaktadır) süregelen laboratuvar kolonilerimizdendir. Kolonilerin tavşanlarda beslenmeleri işlemi TC Namık Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulundan alınan izinlere istinaden (Tarih 04.12.2014, Toplantı sayısı 2014/08, Karar sayısı 4 ve Tarih 07.04.2016, Toplantı sayısı 2016/04, Karar sayısı 9), TC Namık Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

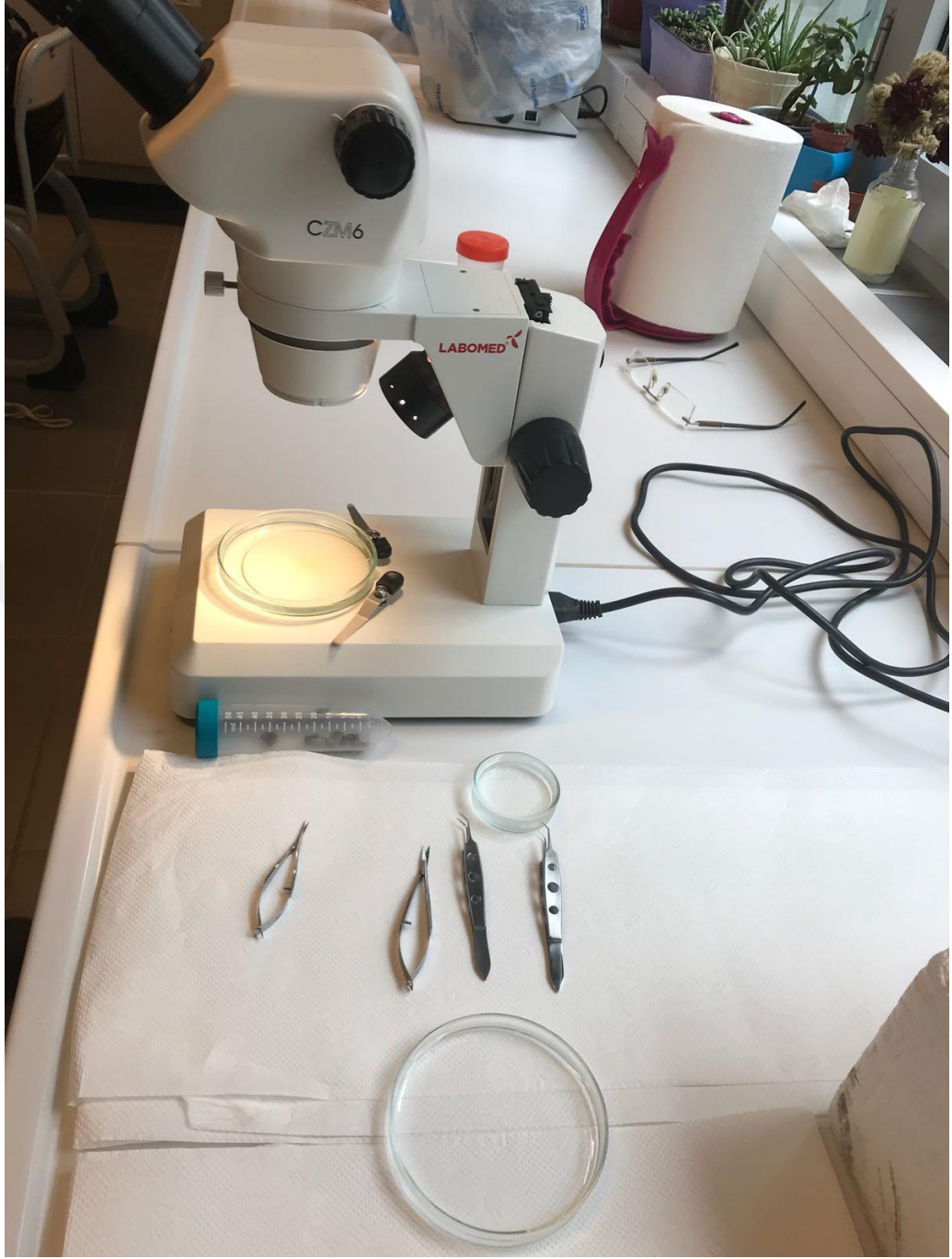
Çalışmada ergin dişi kenelerin tükürük bezi ekstraktlarından yararlanılmıştır. Kenelere ait larva ve nimfler tavşanlarda beslenmiş ve nihayetinde elde edilen doymuş nimflerin inkubatörde (*H. marginatum* ve *R. bursa* 25-27 °C, %70-80 nem, *D. marginatus* 20-22 °C, %75-85) nem gömlek değiştirip aç ergin haline gelmeleri sağlanmıştır. Aktive olan aç erginler, uzun süreli muhafaza amacıyla soğutmalı etüve alınmış (*H. marginatum* ve *R. bursa* +13 °C, %75-85 nem, *D. marginatus* +4 °C, %90 nem) ve bir sonraki aşamada kullanılmaya kadar burada muhafaza edilmişlerdir.

Ergin kenelerin beslenmesi amacıyla, tavşanların kulaklarına beyaz pamuk kumaştan torba yerleştirilmiştir. Kulağın, içerisinde rahat bir şekilde kontrol edilebileceği büyüklükte ve huni şeklinde hazırlanan torbanın dar kısmı, kulağın traş edilerek flasterle sarılmış taban kısmına yine flaster kullanarak yapıştırılmıştır. Kulak hazırlandıktan bir gün sonra tavşanın kulakları ve genel durumu muayene edilmiş ve takibinde her bir kulağa yerleştirilmiş torbanın içine 6 dişi ve 8 erkek aç ergin kene konmuştur. Takibinde torbaların üst kısımları hemen kulak hizasının üzerinden büzülüp flasterle kapatılmıştır. Adlibitum su ve yem sağlanan tavşanlar TC

Namık Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan tavşan laboratuvarındaki özel kafeslerde tutulmuşlardır. Tavşanların ve kulaktaki kenelerin durumu günlük olarak kontrol edilmiştir.

3.4. Kenelerden Tükürük Bezlerinin Eldesi

Kulağa yerleştirilmiş kenelerin, yapılan günlük takiplerde hızlı doyma aşamasına (beslenmenin son aşaması) girdikleri tespit edilen dişileri bir pens yardımıyla kulaktan alınmışlardır. Bu noktada, kenenin hasar görmemesine, gövdesine baskı yapılmamasına ve ağız organellerinin kopmamasına dikkat edilmiştir. Toplanan dişi keneler distile su ile yıkanmış ve bir petrideki steril PBS (+4 °C) içerisine alınmış ve steryomikroskop altında, mikrocerrahi seti kullanılarak tükürük bezleri çıkarılmıştır (Şekil 3.1). Çıkarılan tükürük bezleri ayrı bir petride ve yine steril PBS içerisinde diğer doku artıklarından titizlikle arındırılmıştır (Şekil 3.2). Takibinde tüpe alınan tükürük bezleri steril PBS ile 3 kere yıkanmış ve yine tüp içerisinde, ekstraksiyon gerçekleştirilinceye kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışma sırasında, kene tükürük bezi eldesi öncesindeki görüntü.



Şekil 3.2. Petriye alınmış kene tükürük bezleri

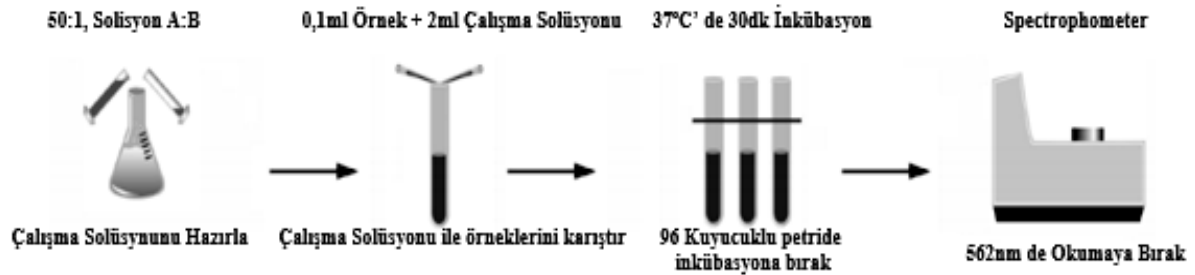
3.5. Kene Tükürük Bezi Ekstraktlarının Hazırlanması

Dondurucuda muhafaza edilmekte olan kene tükürük bezleri, santrifüj tüplerinden çıkartılarak, önceden hazırlanmış homojenizatör tüplerine yerleştirilmiştir. Aynı tüplerin içerisine önceden steril edilmiş metal bilyeler konmuştur. Ardından tüplerin ağzları kapatılarak homojenizatörün içine yerleştirilmiştir. Tüpler homojenizatörde 12.000 g'de +4°C sıcaklıkta 10 dk döndürülmüştür. Elde edilen süspansiyon tekrar santrifüj tüplerine aktarılmış ve 15.000 rpm'de, 5 dk santrifüje edilmiştir. Süpernatant, dipteki doku artıklarından kaynaklı pelet kaldırılmadan dikkatlice alınmıştır. Toplanan tükürük ekstraktı, başka bir steril santrifüj tüpüne konmuş, etiketlenmiş ve bir sonraki aşamada kullanılıncaya kadar -80 °C'de, muhafaza altına alınmıştır.

3.6. Tükürük Bezi Ekstraktında Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Deney süresince, kene tükürük salgıları, fEKH Besi yeri içinde (V/V) olacak şekilde karıştırılarak kullanılmıştır. Besi yeri içeriğindeki proteinlerin standart olması ve protein konsantrasyonunun bilinmesi amacı ile “Protein Concentration Assay (BCA)” yöntemi ile elde edilen stok halindeki kene tükürük salgısının protein konsantrasyonu protein konsantrasyon testi (BCA) ile tayin edilmiştir.

BCA süreci kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3): Elde edilen kene tükürük salgılarının protein konsantrasyonunu ölçmek için “Thermo Fisher Scientific-Pierce™ BSA Protein Assay” (23225) kiti kullanılmıştır. Protein Assay kiti; örneklerin protein konsantrasyonunu, kontrol gruplarındaki protein miktarı bilinen sığır serum albuminleriyle (BSA) karşılaştırarak belirlemeye dayalı bir testtir. Protein konsantrasyonunun ölçümü için 96-kuyucuklu petri kapları kullanılmıştır. Kontrol grupları, daha önceden protein konsantrasyonu bilinen BSA’lar ile farklı derişimlere ayrılmıştır (Çizelge 3.3).



Şekil 3.3. BCA testi aşamaları.

Protokole uygun şekilde çalışma solüsyonu hazırlanmış, kontrol değerler ve örneklerimiz bu çalışma solüsyonlarıyla karıştırılarak 96-kuyucuklu petri kaplarına aktarılmıştır. Her kuyucuğa 25µl çalışma solüsyonu gelecek şekilde örnek karışımları yerleştirilmiş ve 37°C’de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, petri kabı 562 nm’de spektrometrede okunmaya bırakılmıştır (Şekil 3.3). Farklı konsantrasyonlardaki 9 adet BSA kontrolleri ile birlikte 3 farklı kene tükürük salgısı solüsyonu konmuştur. Testin doğruluğunu teyit etmek amacıyla, bu örneklerin aynı petri kabı üzerinde 3 tekrarı yapılmıştır.

Çizelge 3.3. BCA testinde kontrol grup derişimlerini ayarlarken kullanılan konsantrasyon örnekleri.

Tüp	PBS Miktarı (µl)	BSA Miktarı (µl)	Son BSA Konsantrasyonu (µg/ml)
A	0	Stoktan 300	2000
B	125	Stoktan 375	1500
C	325	Stoktan 325	1000
D	175	B' den 175	750
E	325	C' den 325	500
F	325	E' den 325	250
G	325	F' den 325	125
H	400	G' den 100	25
I	400	0	0

Protein konsantrasyonları belirlenen kene tükürük salgıları, in vitro hücre kültüründe kullanılabilecek konuma getirmek amacıyla sterile edilmişlerdir. Sterilizasyon işlemi, salgıların 0,22 µm porlu filtreden geçirilerek yapılmıştır. Son olarak; 3 farklı türden elde edilen kene tükürük salgıları küçük hacimlerde saklanmıştır. Proteinlerin çöz dondur işleminde bozulmaması için tüpler “tek kullanım için” (içlerinde bir deneyde kullanılacak miktarlar bulunan) ve “stok” olarak ikiye ayrılmışlardır. Tek kullanım için olan stokların son konsantrasyonu 16µg/ml’dir. Solüsyonlar -80°C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.7.1. Besiyerlerinin hazırlanması

D10 (Fef besiyeri) hazırlanması:

Steril kabin altında; 500 ml DMEM (1x, Basic) (Ca, Mg içermeyen) (+pirüvat), 55 ml fetal sıgır albumin (FBS) (15% v/v), 5 ml L-Glutamin, 5,5 ml 1x penisilin/streptomisin streptomycin (1,5% v/v), eklenerek karıştırıldı ve 0,22 µm porlu filtre ile karışım siterile edildi.

Muhafaza koşulu: 1 ay süresince, +4°C’ de muhafaza edildi.

FBS EKH besiyeri hazırlanması:

Steril kabin altında; 55 ml FSB (%15 (v/v)), 5 ml esansiyel olmyan aminoasit (1% (v/v)), 5ml penisilin streptomisin (1% (v/v)), 5ml L-Glutamin (1% (v/v)), 0.1 Mm 2-Merkaptoethanol ($\mu\text{l}/100\text{ml}$)), 1000 IU/ml LIF, 1 μM PD0325901, 3 μM CHIR99021 eklendikten sonra DMEM ile besiyeri 500 ml'e tamamlandı. Ardından, 0,22 μm porlu filtre ile karışım siterile edildi.

Muhafaza koşulu: 1 ay süresince, +4°C' de muhafaza edildi.

KOSR EKH besiyeri hazırlanması:

Steril kabin altında; 55 ml Kcock Out DMEM (KOSR) (%15 (v/v)), 5 ml esansiyel olmyan aminoasit (1% v/v), 5ml penisilin streptomisin (1% v/v), 5ml L-Glutamin (1% v/v), 0.1 Mm 2-Merkaptoethanol ($\mu\text{l}/100\text{ml}$)), 1000 IU/ml LIF, 1 μM PD0325901, 3 μM CHIR99021 eklendikten sonra KOSR ile besiyeri 500 ml'e tamamlandı. Ardından 0,22 μm porlu filtre ile karışım siteril edildi.

Muhafaza koşulu: 1 ay süresince, +4°C' de muhafaza edildi.

Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt içeren KOSR EKH besiyeri hazırlanması:

Dondurularak -80 °C' de saklanmış tükürük bezi ekstraktları kullanımlarından hemen önce çözündürülmüştür.

Farklı uygulama konsantrasyonları hacim üzerinden (v/v) olacak şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Kene tükürük bezi ekstraktı katkılı EKH besi yeri hazırlarken kullanılan hacimlere göre sabitlenmiş protein konsantrasyonu bilgileri.

Tür	Tükürük Salgısı Konsantrasyonu (v/v)					
<i>H. manginatum</i>	0,01 $\mu\text{l}/\text{ml}$	0,1 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1 $\mu\text{l}/\text{ml}$	2 $\mu\text{l}/\text{ml}$	5 $\mu\text{l}/\text{ml}$	10 $\mu\text{l}/\text{ml}$
<i>R. bursa</i>	0,01 $\mu\text{l}/\text{ml}$	0,1 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1 $\mu\text{l}/\text{ml}$	2 $\mu\text{l}/\text{ml}$	5 $\mu\text{l}/\text{ml}$	10 $\mu\text{l}/\text{ml}$
<i>D. marginatus</i>	0,01 $\mu\text{l}/\text{ml}$	0,1 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1 $\mu\text{l}/\text{ml}$	2 $\mu\text{l}/\text{ml}$	5 $\mu\text{l}/\text{ml}$	10 $\mu\text{l}/\text{ml}$
Tür	Protein Konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
<i>H. manginatum</i>	0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	80 $\mu\text{g}/\text{ml}$	160 $\mu\text{g}/\text{ml}$

<i>R. bursa</i>	0,2 µg/ml	2 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	160 µg/ml
<i>D. marginatus</i>	0,2 µg/ml	2 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	160 µg/ml

Üç farklı kene türünden elde edilen tükürük bezi ekstraktları, 10µl/ml (v/v) KOSR EKH besiyeri olacak şekilde karıştırılmıştır. Bu besiyerinin yarısı düşük derişimler için sulandırılmıştır. Böylece, 6 farklı derişimde steril kene tükürük salgısı katkılı KOSR EKH besiyeri elde edilmiştir (Çizelge 3.4).

Muhafaza koşulları: Kullanılacağı gün hazırlandı, tek seferde kullanıldı.

3.7.2. Tükürük bezi ekstraktlarının FEKH üzerine uygulanması

Deneme öncesinde hazırlıklar yapılmış, 4 adet 96 kuyulu petri hazırlanmış ve Petriler %1 jelatin ile kaplanmıştır. Ardından mitomisin ile inaktive edilmiş besleyici hücre tabakası (FEF), her kuyuya 500 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. FEF'lerin jelatin üzerine tutunmaları için 1 gece beklenmiştir.

Petrilerden biri kontrol için kullanılmıştır. Deneyin birinci günü FEKH ekilmeden kontrol petrisi sonlandırılarak canlı FEF hücrelerinin sayısına bakılmıştır. Kalan 3 petriye FEKH'ler ekildi ve petriler, sırasıyla deneyin ikinci (erken evre), beşinci (orta evre) ve yedinci (geç evre) günlerinde sonlandırılarak gruptaki hücre sayılarına CGT testi ile bakılması planlanmıştır.

0. Gün: Önceden 1ml'lik tüplerde DMSO ile dondurularak saklanmış CB6F1 ırkı farelerden elde edilmiş, fare embriyonik kök hücre hatları kullanılmıştır. Tüpler -80°C'den çıkartılarak su banyosuna kondu. Su banyosunda çözüldükten sonra, 1 ml FBS EKH besiyeri ile karıştırılarak dondurma besiyerindeki DMSO inhibe edildi. Karışım, ardından 500 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi. Tüpün dibinde pelet şeklinde gözüken fare embriyonik kök hücreleri alınmadan süpernatant çekildi. Kalan süpernatant, KOSR EKH besiyeri ile karıştırılarak FEF üzerine ekildi. mEKH'ler bir gün önceden hazırlanan 4 petrinin 3'üne ekildi. Petriler, FEKH'lerin zemine tutunması için, bir gün inkübasyona bırakıldı.

Kontrol olarak hazırlanan mEKH ekilmemiş petri sonlandırılarak CTG testi ile canlı hücre sayılarına bakıldı.

1. Gün: Petrillerdeki kuyucukların üzerindeki KOSR EKH besiyerinin tamamı çekildi. Yerine, farklı derişimlerde o gün hazırlanmış kene tükürük bezi ekstraktı içeren KOSR EKH besiyeri eklendi.

2. Gün: Kalan üç adet petriden birinde deney bitirildi (erken evre grubu). CTG testi ile petrideki canlı hücre sayılarına bakıldı.

Petrideki kuyucukların üzerindeki KOSR EKH besiyerinin yarısı çekildi. Yerine, çekilen miktar kadar, taze hazırlanmış farklı derişimlerde tükürük bezi ekstraktı içeren KOSR EKH besiyeri eklendi.

4. Gün: Petrillerdeki besiyerinin yarısı alındı ve alınan miktar kadar taze hazırlanmış kene tükürük bezi ekstraktı içeren KOSR EKH ilave edildi.

5. Gün: Kalan iki adet petriden birinde deney bitirildi (orta evre grubu). CTG testi ile petrideki canlı hücre sayılarına bakıldı.

6. Gün: Petrillerdeki besiyerinin yarısı alındı ve alınan miktar kadar taze hazırlanmış kene tükürük bezi ekstraktı içeren KOSR EKH ilave edildi.

7. Gün: Kalan son petride deney bitirildi (geç evre grubu). CTG testi ile petrideki canlı hücre sayılarına bakıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Çalışmada, kene tükürük salgısının FEKH'leri üzerine uygulanmasını günlük gösteren diyagram.

3.7.3. CTG Testi İle Hücre Canlılık Oranlarının Belirlenmesi

Canlılık testi için "CellTiter-Glo® (CTG) Luminescent Cell Viability Assay" (G7570-Promega) kiti kullanılmıştır. CTG testi canlı hücreleri ATP miktarını ölçmeye dayalı bir testtir (Şekil 3.5). Canlılık deneyi için, siyah 96-kuyucuklu petri kapları kullanılmıştır. Her kuyucuğa 500 adet FEF ekilmiştir ki kuyucuklardaki hücre sayısı mESC'ler ile artmış bulunmaktadır. Deney süreci biten petri kapları, kitin protokolüne uygun olarak Cell Titer-GLO solüsyonu, 1:10 oranında KOSR MESC besiyerine eklendi. Petri kapları, okuyucuya (Synergy H1, BioTek) yerleştirilerek, kuyucuklardaki canlı hücre sonuçlar görüntülendi.



Şekil 3.5. CTG testi sırasında gerçekleşen reaksiyon (CellTiter-Glo®, Promega).

Farklı günlerde sonlandırılan deneylerin CTG ışımaya verileri analizleri hesaplanırken; öncelikle kontrol grubu verilerinin ortalamaları yine kendisi ile bölünerek "1 (bir)" değerine ulaşılmıştır. Böylelikle kontrol grubu sonuçları 1 kabul edilmiştir. Deney grubu sonuçları; deney grubu verilerinin ortalamaları, kontrol grubu ortalamalarına bölünerek elde edilmiştir. Böylece deney grupları ile kontrol arasındaki fark numerik bir değer olarak gösterilebilmiştir.

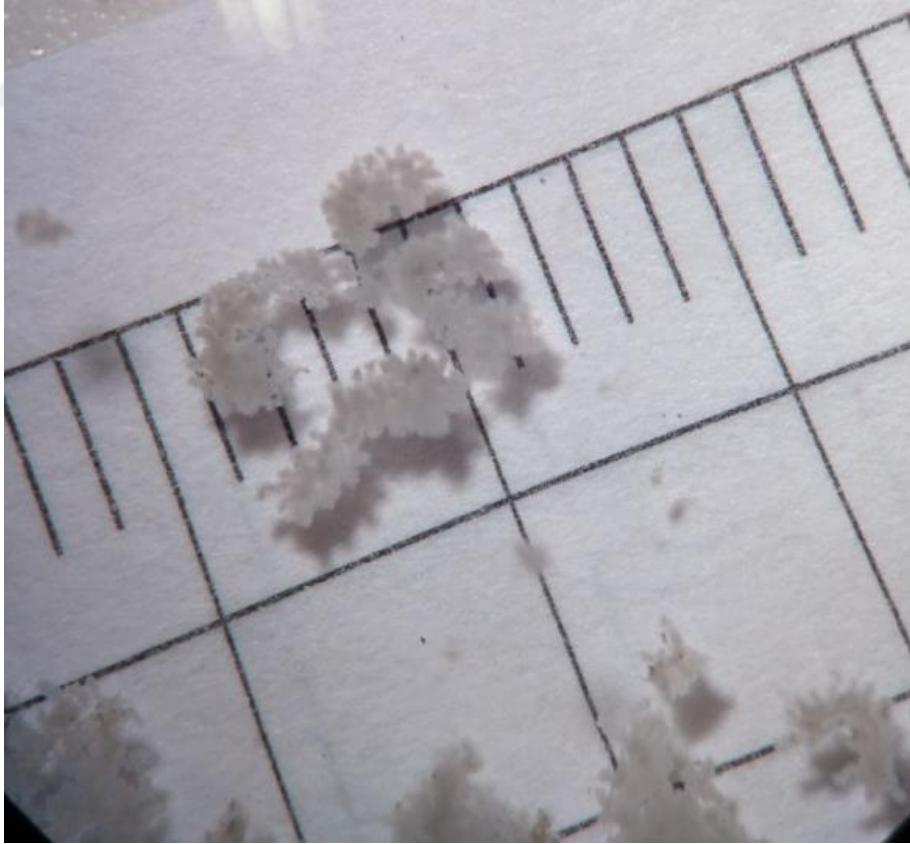
Hata çubuğunun sonuçları; kontrol ve deney gruplarının standart varyasyonları bulunarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, deney sonuçlarımızın alt ve üst limiti olarak gösterilmiştir.

3.7. Verilerin istatistiksel analizleri

Anlamlılık testi (T-Test) sonuçları; CTG testi verilerini anlamlandırmak için; çift kuyruklu dağılım ve iki örnekli eşit varyans (homoskedastik) t-test analizi kullanıldı. Elde edilen sonuçlara istatistiksel anlamlılık P değeri 0.05 üzerinden verildi. P değeri ≤0.05 olan değerler güvenilir kabul edildi. Bu test deney grupları ile kontrol grupları arasında yapılmış olup, pozitif veya negatif sonuçların anlamlı bir farklarının olup olmadığı belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapılan bu tez çalışmasında; tavşanların kulaklarında beslenen ve düşmeden hemen önce toplanarak diseke edilen kenelerin tükürük bezleri (Şekil 4.1) temel çalışma materyalini oluşturmuş ve tükürük bezlerinden elde edilen ekstraktlar in vitro kültür koşullarında hedef hücrelere uygulanarak olası etkinlikleri izlenmiştir. Hücrelerdeki canlılık deneyi için, siyah 96-kuyucuklu petri kapları kullanılmış, her kuyucuğa, daha önce Balb/c ırkı deney fare fibroblastlarından izole edilen 500 adet FEF ekilmiş ve FEF'lerin üzerine de CB6F1/J (Balb/c x C57BL/6J) ırkı deney farelerinden elde edilen blastosistlerden izole edilen fEKH'ler eklenmiştir. Üç farklı kene türünden (*D. marginatus*, *R. bursa* and *H. marginatum*) izole edilen tükürük bezi ekstraktları 6 farklı (0.2 µg/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 160 µg/ml) konsantrasyonlarda kök hücre besiyeri (Knock Out-DMEM+15% Knock Out-Serum)'ne eklenerek fEKH kültürüne uygulanmış ve 37°C sıcaklıkta, 5% CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi 2 (erken evre), 5 (orta evre) ve 7 günlük (geç evre) periyodlar şeklinde ayarlanmış ve süreç sonunda "CellTiter-Glo® (CTG)" testi ile hücrelerin canlılık oranlarına bakılmıştır.



Şekil 4.1. Kene tükürük bezinin steryomikroskop görüntüsü (min. bar 1mm).

4.1. *H. marginatum* tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerin canlılığı üzerine etkisi

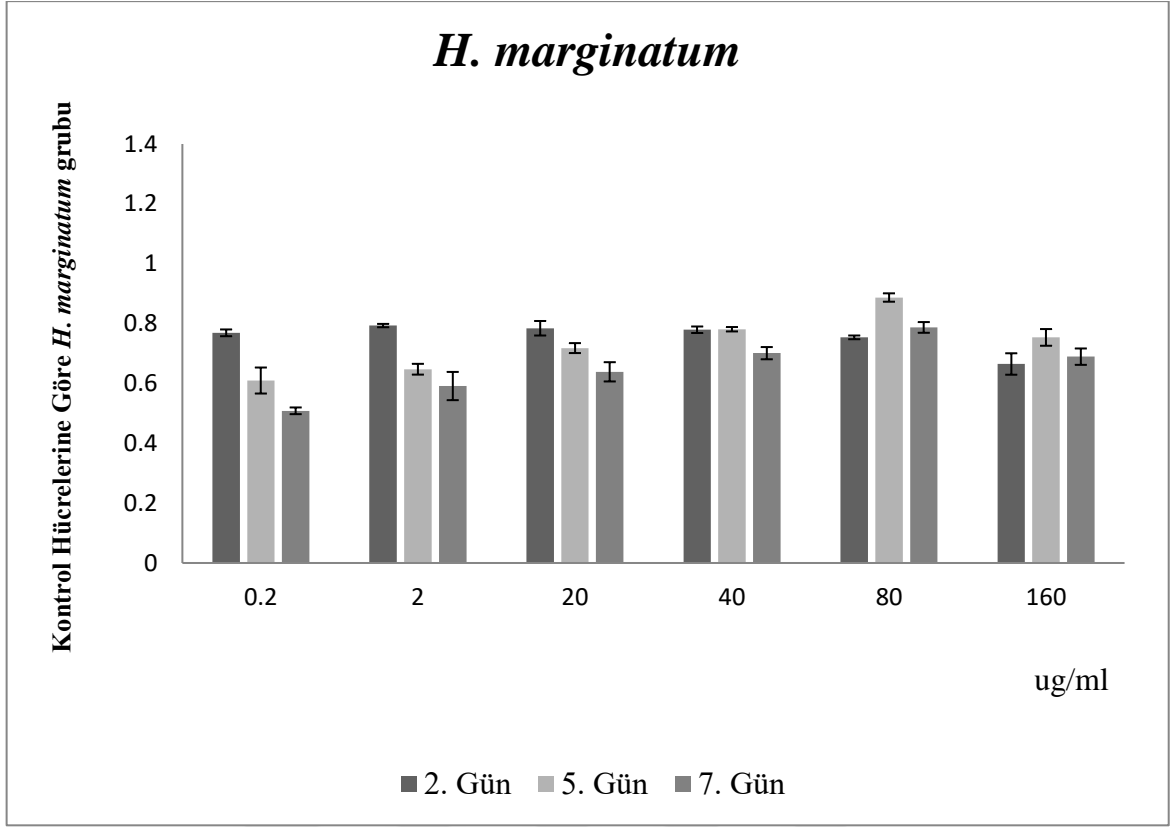
Fare embriyonik kök hücrelerinde, *H. marginatum* kene tükürük salgısının hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için yapılan CTG testi ışına verileri (deney gruplarının kontrole göre kat sayıları, hata çubuğu ve anlamlılık testi) Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. CTG testine göre, *H. marginatum* tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine olan etkisinin ışına verileri (deney gruplarının kontrole göre kat sayıları, hata çubuğu ve anlamlılık testi).

<i>Hyalomma marginatum</i>									
Deneme Süreleri									
Gün	Deney Gruplarının Kontrole Göre Kat Sayıları			Hata Çubuğu			Anlamlılık Testi (T-TEST)		
	2. Gün	5. Gün	7. Gün	2. Gün	5. Gün	7. Gün	2. Gün	5. Gün	7. Gün
Kontrol	1	1	1	0.030611	0.1566564	0.127635			
0.2µg/ml	0.769079	0.609701	0.508509	0.011258	0.0434412	0.011147	0.000018	0.006356	0.002663
2µg/ml	0.793304	0.647425	0.591277	0.005554	0.0180368	0.047136	0.000029	0.009376	0.006502
20µg/ml	0.784339	0.718067	0.638772	0.024279	0.0166509	0.032216	0.000048	0.023710	0.008951
40µg/ml	0.779312	0.781066	0.701096	0.010872	0.0073358	0.020423	0.000023	0.057649	0.016059
80µg/ml	0.753910	0.887040	0.787120	0.006226	0.0139983	0.017892	0.000011	0.272902	0.045889
160µg/ml	0.66490	0.753753	0.689389	0.035843	0.0278814	0.027389	0.000007	0.039825	0.014597

Fare embriyonik kök hücrelerinde, *H. marginatum* kene tükürük salgısının hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için yapılan CTG testi sonuçları Şekil 4.2'de verilmiştir.

Sonuçlarda görüldüğü gibi, *H. marginatum* tükürük bezi ekstraktı katkılı fEKH kültürünün erken (2. gün), orta (5. gün) geç (7. gün) evrelerinde fEKH'lerin proliferasyonu üzerine negatif yönde etkilediği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. CTG testine göre, farklı doz ve uygulama sürelerinde, *H. marginatum* tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine etkisi (1.0 kabul edilen kontrole göre kıyas değerleri).

4.2. *R. bursa* tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerin canlılığı üzerine etkisi

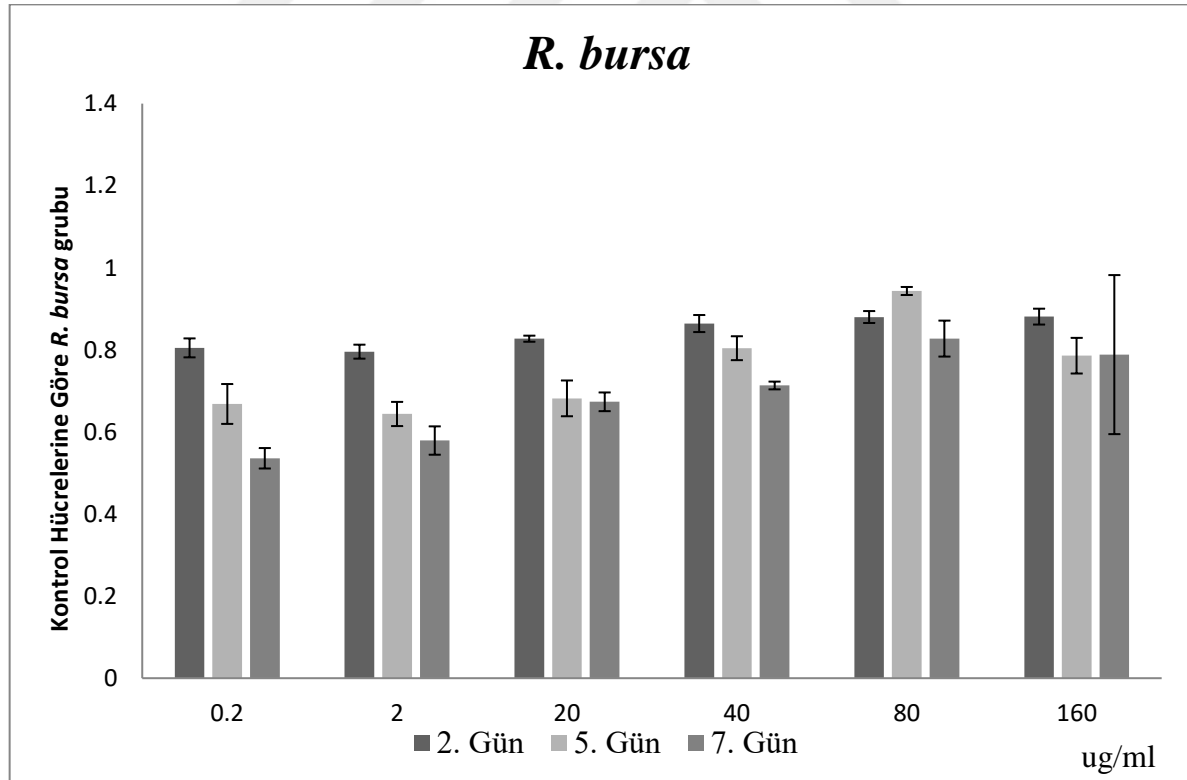
Fare embriyonik kök hücrelerinde, *R. bursa* kene tükürük salgısının hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için yapılan CTG testi ışına verileri (Deney gruplarının kontrole göre kat sayıları, hata çubuğu ve anlamlılık testi) Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Fare embriyonik kök hücrelerinde, *R. bursa* kene tükürük salgısının hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için yapılan CTG testi sonuçları Şekil 4.3'te verilmiştir.

Sonuçlarda görüldüğü gibi, *R. bursa* tükürük bezi ekstraktı katkılı fEKH kültürünün erken (2. gün), orta (5. gün) geç (7. gün) evrelerinde fEKH'lerin proliferasyonu üzerine negatif yönde etkilediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.6. CTG testine göre, *R. bursa* tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine olan etkisinin ışına verileri (deney gruplarının kontrole göre kat sayıları, hata çubuğu ve anlamlılık testi).

<i>Rhipicephalus bursa</i>									
Deneme Süreleri									
Gün	Deney Gruplarının Kontrole Göre Kat Sayıları			Hata Çubuğu			Anlamlılık Testi (T-TEST)		
	2. Gün	5. Gün	7. Gün	2. Gün	5. Gün	7. Gün	2. Gün	5. Gün	7. Gün
Kontrol	1	1	1	0.0306112	0.156656	0.127635			
0.2µg/ml	0.804851	0.668204	0.535863	0.0230637	0.048574	0.024901	0.000080	0.013311	0.003479
2µg/ml	0.795636	0.643792	0.579075	0.0170153	0.029443	0.034543	0.000045	0.009179	0.005280
20µg/ml	0.827220	0.681849	0.673456	0.0074069	0.043575	0.022787	0.000085	0.015575	0.012040
40µg/ml	0.864192	0.804082	0.713241	0.0207536	0.029120	0.009453	0.000532	0.082795	0.017829
80µg/ml	0.880040	0.943482	0.827495	0.0145249	0.009780	0.043804	0.000790	0.567683	0.091202
160µg/ml	0.881014	0.785807	0.788490	0.0193212	0.043430	0.193744	0.001005	0.065426	0.189477



Şekil 4.3. CTG testine göre, farklı doz ve uygulama sürelerinde, *R. bursa* tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine etkisi (1.0 kabul edilen kontrole göre kıyas değerleri).

4.3. *D. marginatus* tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerin canlılığı üzerine etkisi

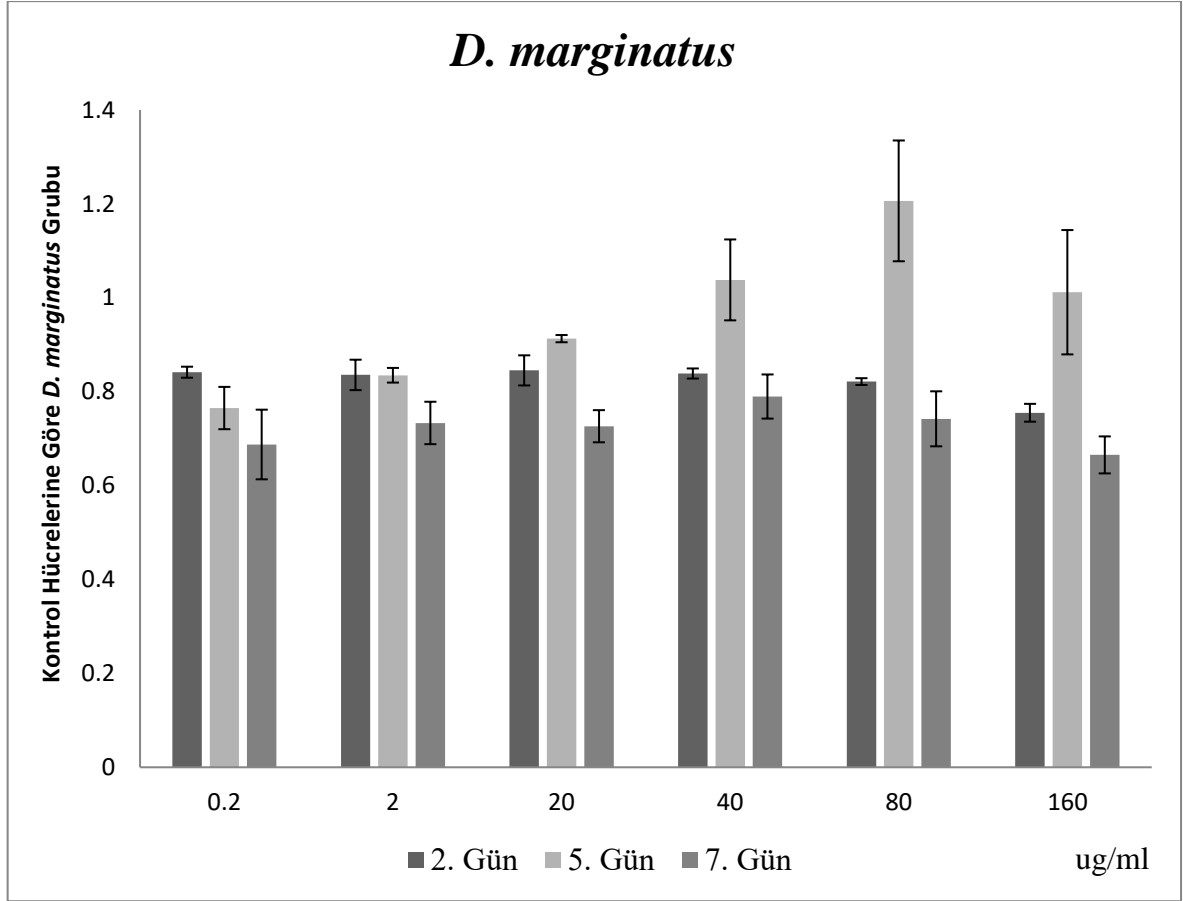
Fare embriyonik kök hücrelerinde, *D. marginatus* kene tükürük bezi ekstraktının hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için yapılan CTG testi ışına verileri (deney gruplarının kontrole göre kat sayıları, hata çubuğu ve anlamlılık testi) Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Fare embriyonik kök hücrelerinde, *D. marginatus* tükürük bezi ekstraktının hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için yapılan CTG testi sonuçları Şekil 4.4’de verilmiştir.

Sonuçlarda görüldüğü gibi, 80 µg/ml derişimde *D. marginatus* tükürük bezi ekstraktı katkılı kültürün 5. gününde, fEKH’lerin proliferasyonu üzerinde olumlu etki görülmektedir. Öte yandan, *D. marginatus* tükürük bezi ekstraktı katkılı fEKH kültürünün erken (2. gün) ve geç (7. gün) evrelerinde fEKH’lerin proliferasyonu üzerine negatif yönde etkilediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.7. CTG testine göre, *D. marginatus* tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine olan etkisinin ışına verileri (deney gruplarının kontrole göre kat sayıları, hata çubuğu ve anlamlılık testi).

<i>Dermacentor marginatus</i>									
Deneme Süreleri									
Gün	Deney Gruplarının Kontrole Göre Kat Sayıları			Hata Çubuğu			Anlamlılık Testi (T-TEST)		
	2. Gün	5. Gün	7. Gün	2. Gün	5. Gün	7. Gün	2. Gün	5. Gün	7. Gün
Kontrol	1	1	1	0.030611	0.156656	0.127635			
0.2µg/ml	0.841484	0.765161	0.687523	0.011746	0.045064	0.074193	0.000157	0.048882	0.021466
2µg/ml	0.835733	0.834983	0.733381	0.032382	0.015603	0.045157	0.000361	0.128506	0.027005
20µg/ml	0.845355	0.912979	0.726433	0.032072	0.007696	0.034253	0.000492	0.387771	0.023054
40µg/ml	0.838699	1.038091	0.789690	0.010783	0.086172	0.047019	0.000138	0.716999	0.055342
80µg/ml	0.821492	1.206444	0.742195	0.007241	0.128636	0.058564	0.000071	0.104529	0.033543
160µg/ml	0.755110	1.011820	0.665346	0.018971	0.132421	0.039382	0.000017	0.917049	0.012258



Şekil 4.4. CTG testine göre, farklı doz ve uygulama sürelerinde, *D. marginatus* tükürük bezi ekstraktının fEK hücrelerine etkisi (1.0 kabul edilen kontrole göre kıyas değerleri).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda, fEK hücreleri için kültür sistemlerinin iyileştirilmesine yönelik kapsamlı araştırmalar iki noktada özellikle gelişme kaydedilmesini sağlamıştır. Bunlar; serumsuz koşullar altında hücrelerin büyümesi ve hücrelerin %100 fare embriyonik fibroblast ile yapılandırılmış besleyici hücre tabakası kullanılmaksızın kendini yenileme ve proliferasyon özelliğini devam ettirmesidir. fEKH blastosistin iç hücre kitleciğinden elde edilmektedir ve bu hücrelerde çok yüksek kendi kendini yenileme özelliğine sahiptir (Hemmati-Brivanlou ve ark. 1992). İlgili çalışmaların erken dönemlerinde, fEKH kültürü FEF besleyici tabakası ve FBS içeren ortamlarda geliştirilebilmiştir. FBS'in, bilinmeyen faktörlerinden dolayı, tamamen pluripotent ve proliferasyon özelliğini koruyabilmiş süreğen fEK kültürü sağlama noktasında sorunlarla karşılaşmıştır. Daha sonra, bufalo-sıçan karaciğeri (BRL) hücreleriyle oluşturulan besleyici hücre tabakası veya "Knockout Serum" içeren ortamların EKH'lerin kendiliğinden farklılaşmasını önlediği görülmüştür (Hemmati-Brivanlou ve ark. 1992; Nichols ve ark. 2001). BRL veya Knockout Serum içeren ortamlarda EKH pluripotent özelliklerini korumuşlardır. İlgili veriler ışığında bu faktörlere "farklılaşma engelleyici faktörler (DIA)" denilmiştir. DIA biyokimyasal olarak incelenmiş ve ona özdeş olan LİF şu anda fEKH'lerin de kendini yenilemesi ve proliferasyonu için kritik bir faktör olarak kabul edilmiştir. Bundan sonra LİF destekli FBS veya Knockout Serum içeren besi yerleri kullanılmaya başlanmıştır (Williams ve ark. 1988). Bu özellikteki besiyerleri EKH'ler için küresel bir standart haline gelmiştir. Besi yerinden LİF çıkarılması ile EKH'ler pluripotent durumlarını hızla kaybetmektedirler. Ayrıca, yakın tarihte bazı transkripsiyon faktörlerin inhibisyonu için PD ve CHIR gibi kimyasallar da kök hücre besiyerine dahil edilmeye başlanmıştır (Eiselleova ve ark. 2008; Tamm ve Ark. 2013). Bu bilgiler doğrultusunda, kök hücrelerin farklılaşmadan kendilerini çoğaltabilmeleri için güncel çalışmalar sürüdürülmektedir.

Sunulan çalışmada, farklı türlerden elde edilen kene tükürük bezi ekstraktı, farklı konsantrasyonlarda fEKH besi yerine eklenmiş ve fEKH'lerin erken (2. gün), orta (5. gün) ve geç (7. gün) evrelerde proliferasyonuna CTG testi ile bakılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, *D. marginatus* türü için; 6 farklı derişimde tükürük bezi ekstraktı bulunan besi yerlerinin tümünün, kültürün erken (2. günü) ve geç (7. gününde) evrelerinde fEKH'lerin proliferasyonu üzerine negatif yönde etkidiği gözlemlenmiştir. Yine, 40µg/ml ve 160µg/ml derişimlerde ekstrakt içeren besi yerlerin kullanıldığı kültürlerin orta evrede (5. gün) kontrol fEKH sayılarına benzerlik göstermiştir. Öte yandan, 80µg/ml

derişiminde ekstrakt içeren besiyeri kültürünün orta evresinde (5. gün), fEKH'lerin proliferasyonu üzerine olumlu etki görülürken, geç evrede (7. gün) besiyerinin artık olumlu etki yapmadığı izlenmiştir.

Hyalomma marginatum türü için; 6 farklı derişimde ekstrakt bulunan besi yerlerinin tümünün, kültürün her evresinde (2. gün, 5. gün, 7. gün) fEKH'lerin proliferasyonu üzerine negatif etki görülmüştür. *D. marginatus* ve *H. marginatum* gruplarının kullanıldığı hücre kültürlerinde, yüksek derişimde kene tükürük salgısı kullanılan (40µg/ml, 80µg/ml, 160µg/ml) kültürlerin orta evrelerinde (5. gün) maksimum yararlı etki izlenmiştir.

Rhipicephalus bursa türü için; 6 farklı derişimde ekstrakt bulunan besi yerlerinin tümünün, kültürün her evresinde (2. gün, 5. gün, 7. gün) fEKH'lerin proliferasyonu üzerine negatif etki izlenmiştir. *H. marginatum* ve *R. bursa* gruplarının kullanıldığı hücre kültürlerinde, düşük derişimlerde ekstrakt kullanılan (0.2 µg/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml) kültürlerin erken evrelerinde (2. gün) maksimum yararlı etki görülmüştür.

Bütün besiyerlerindeki göze çarpan ortak özellik, düşük derişimli kene tükürük salgısı içeren besi yerlerinin erken evrelerinde proliferasyonun daha yüksek olduğu, derişim yükseldikçe proliferasyonun orta evrede daha yüksek görülmeye başladığıdır. Bu süreçlerde *D. marginatus* grubu diğerlerinden farklılık göstermektedir. Çünkü bu gruptaki en yüksek proliferasyon gösteren gruplar kontrol değerlerinin üzerinde çıkmışlardır. Bu özellik *H. marginatum* ve *R. bursa* grupları için geçerli değildir.

Bu çalışma, konusu itibariyle dünyada bir ilk durumundadır. İlgili nedenden dolayı, elde edilen verileri literatür bilgisiyle karşılaştırmalı olarak ele almak zordur. Ancak, en azından, veriler kenelerde tükürük salgısının oldukça yüksek ve çeşitlilik arz eden bir biyoetkinlik potansiyeli taşıdığını (Arolas ve ark. 2005; Brake ve ar. 2010; Akagi ve ark. 2012; Cao ve ark. 2013; Carneiro-Lobo ve ark. 2012) ve söz konusu potansiyelin kenenin türünden türüne değiştiğini (Kotsyfakis ve ark. 2007; Narasimhan ve ark. 2007; Francischetti ve ark. 2009) bir kere daha göstermiştir. Çalışmada elde edilen negatif veya *D. marginatus* özelinde görülen doz ilişkili pozitif etkinin mekanizmasını nedenselleştirmek güçtür. Ancak, kene tükürük salgısında bulunan birçok maddenin hücrelerde pek çok reseptör tipi ile etkileşime girerek sinyal iletim yolları üzerinden iş gördüğü bilinmektedir ki bu etki noktasında da oldukça belirgin bir çeşitlilikten söz edilmektedir (Arolas ve ark. 2005; Brake ve ar. 2010; Akagi ve ark. 2012; Cao ve ark. 2013; Carneiro-Lobo ve ark. 2012).

Sonuç olarak; *D. marginatus* gruplarının tükürük derişimlerini 40µg/ml-160µg/ml aralığında çeşitlendirmek gereklidir. Bizim alışmamızda 80µg/ml derişim grubumuzda maksimum proliferasyon yüzdesini görsek de başka bir derişim değeri bizim bulduğumuz değerin üzerine çıkabilir. Ayrıca devam eden çalışmalarda, proliferasyonu hangi protein veya proteinlerin etkilediğini bulmak için proteomiks çalışmaları yapılmalıdır. Bunlar ile birlikte fEKH'lerin proiferasyonunu hangi yolakların etkilediğini görmek için qPCR testleri de gerekmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Akagi EM, Júnior PL, Simons SM, Bellini MH, Barreto SA, Chudzinski-Tavassi AM (2012). Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. *Biomed Pharmacother*, 66(1):64-69.
- Arolas JL, Lorenzo J, Rovira A, Castella J, Aviles FX, Sommerhoff CP (2005). A arboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. *J Biol Chem*, 280:3441-3448.
- Asch R, Simerly C, Ord T, Ord VA, Schatten G (1995). The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Human Reprod*, 10(7): 1897–906.
- Austin G (2001). embryo derived stem cells: of mice and man. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:435–462.
- Aydin L, Bakirci S (2007). Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitol Res*, 101(2):163-166.
- Tu AT, Motoyashiki T, Azimova DA (2005). Bioactive compounds in tick and mite venoms (saliva). *Toxin Rev*, 24:143-174.
- Baran ÖP, Nergiz Y, Bahçeci S (2007). Göbek kordonu kan ve stromal kökenli hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşması. *Dicle Tıp Dergisi*, 34:233-238.
- Barker SC, Murrell A (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. In: *Ticks: Biology, Disease and Control*. Bowman AS, Nuttall PA (eds.). First Edition, Cambridge University Press, Cambridge, pp.1-39.
- Binder JR, Desai RH, Graves WW, Conant LL (2009). Where is the semantic system? A critical review and meta-analysis of 120 functional neuroimaging studies. *Cereb Cortex*, 19(12):2767–2796.
- Brake DK, Wikel SK, Tidwell JP, de León AAP (2010). *Rhipicephalus microplus* salivary gland molecules induce differential CD86 expression in murine macrophages. *Parasit Vectors*, 3:103.
- Brown SJ, Galli SJ, Gleich GJ, Askenase PW (1982). Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: co-operation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. *J Immunol*, 129:790-796.
- Bursali A, Keskin A, Tekin S (2012). A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Turkey: species diversity, hosts and geographical distribution. *Exp Appl Acarol*, 57:91–104.
- Cao J, Shi L, Zhou Y, Gao X, Zhang H, Gong H, Zhou J (2013). Characterization of a new Kunitz-type serine protease inhibitor from the hard tick *Rhipicephalus hemaphysaloides*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 84(2):104-113.
- Carneiro-Lobo TC, König S, Machado DE, Nasciutti LE, Forni MF, Francischetti IM, Sogayar MC, Monteiro RQ (2009). Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. *J Thromb Haemost*, 7(11):1855-1864.

- Carneiro-Lobo TC, Schaffner F, Disse J, Ostergaard H, Francischetti IM, Monteiro RQ, Ruf W (2012). The tick-derived inhibitor Ixolaris prevents tissue factor signaling on tumor cells. *J Thromb Haemost*, 10(9):1849-1858.
- Carvalho-Costa TM, Mendes MT, da Silva MV, da Costa TA, Tiburcio MGS, ACBM Anhô, Rodrigues Jr V, Oliveira CJF (2015). Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. *Parasit Vectors*, 8(1):22.
- Cheng J, Dutra A, Takesono A, Garrett-Beal L, Schwartzberg PL (2004). Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media. *Genesis*, 39: 100–104.
- Chudzinski-Tavassi AM, De-Sa-Júnior PL, Simons SM, Maria DA, de Souza Ventura J, Batista IF, Faria F, Duraes E, Reis EM, Demasi M (2010). A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. *Toxicon*, 56(7):1145-1154.
- Ciprandi A, de Oliveira SK, Masuda A, Horn F, Termignoni C (2006). *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp Parasitol*, 114:40-46.
- Coons LB, Rothschild M (2008). Ticks (Acari: Ixodida). In: *Encyclopedia of Entomology*, Ed: JL Capinera, Springer Netherlands. pp. 3775-3801.
- Czechanski A, Byers C, Greenstein I, Schrode N, Donahue LR, Hadjantonakis AK, Reinholdt LG (2014). Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and nonpermissive strains. *Nature*, (9):559–574.
- Das S, Banerjee G, DePonte K, Marcantonio N, Kantor FS, Fikrig E (2001). Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *J Infect Dis*, 184:1056-1064.
- de Oliveira Ada S, Lima LG, Mariano-Oliveira A, Machado DE, Nasciutti LE, Andersen JF, Petersen LC, Francischetti IM, Monteiro RQ (2012). Inhibition of tissue factor by Ixolaris reduces primary tumor growth and experimental metastasis in a murine model of melanoma. *Thromb Res*, 130(3):163-170.
- Decrem Y, Beaufays J, Blasioli V, Lahaye K, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E (2008). A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J*, 275(7):1485-1499.
- Díaz-Martín V, Manzano-Román R, Valero L, Oleaga A, Encinas-Grandes A, Pérez-Sánchez R (2013). An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes. *J Proteomics*, 80:216-235.
- Drewes CC, Dias RY, Hebeda CB, Simons SM, Barreto SA, Ferreira Jr JM, Chudzinski-Tavassi AM, Farsky SH (2012). Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicon*, 60(3):333-340.
- Dupejova J, Sterba J, Vancova M, Grubhoffer L (2011). Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick, *Dermacentor marginatus*: structural and functional characterization. *Parasit Vectors*, 4: 4.
- Eiselleova L, Peterkova I, Neradil J, Slaninova I, Hampl A, Dvorak P (2008) Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*, 52:353–363.

- Ewing C, Scorpio A, Nelson DR, Mather TN (1994). Isolation of *Borrelia burgdorferi* from saliva of the tick vector, *Ixodes scapularis*. *J Clin Microbiol*, 32:755-758.
- Ferreira BR, Silva JS (1998). Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Vet Immunol Immunopathol*, 64:279-293.
- Fioravanti C, Burkholder D, Francis B, Siegl PK, Gibson RE (1993). Antithrombotic activity of recombinant tick anticoagulant peptide and heparin in a rabbit model of venous thrombosis. *Thromb Res*, 71(4):317-324.
- Fogaca AC, Almeida IC, Eberlin MN, Tanaka AS, Bulet P, Daffre S (2005). Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides*, 27:667-674.
- Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM (2005). Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thromb Haemost*, 94(1):167-174.
- Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM (2009). The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci*, 14:2051-2088.
- Francischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*, 99:3602-3612.
- Oliveira CJ, Anatriello E, de Miranda-Santos IK, Francischetti IM, Sá-Nunes A, Ferreira BR, Ribeiro JMC (2013). Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by the secretagogues pilocarpine and dopamine. *Ticks and Tick-borne Dis*, 4:469-477.
- Freitas DR, Rosa RM, Moura DJ, Seitz AL, Colodel EM, Driemeier D, Vaz Jr S, Masuda A (2007). Cell death during preoviposition period in *Boophilus microplus* tick. *Vet Parasitol*, 144:321-327.
- Fukumoto S, Sakaguchi T, You M, Xuan X, Fujisaki K (2006). Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. *Microvasc Res*, 71(3):218-221.
- Gern L (2005). The biology of the *Ixodes ricinus* tick. *Ther Umsch*, 62(11):707-712.
- Gill HS (1986). Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. *Parasitol*, 93(2):305-315.
- Gillespie RD, Dolan MC, Piesman J, Titus RG (2001). Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J Immunol*, 166:4319-4326.
- Güneş AM (2005). Kök hücre plastisitesi ve tıptaki kullanım alanları. *Güncel Pediatri*, 36- 42.
- Hajnická V, Vancová-Stibraniova I, Slovak M, Kocakova P, Nuttall PA (2011). Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. *Int J Parasitol*, 41:213-223.
- Hannier S, Liversidge J, Sternberg JM, Bowman AS (2003). *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite Immunol*, 25:27-37.

- Calvin B. Harley (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res*, 256(2-6):271-282.
- Hoffmann G, Hörcher F, Schein E, Gerber H (1971). Saisonalis Auftreten von Zecken und Piroplasmen bei Haustieren in Asiatischen Provinzen der Türkei. *Berl MÜch Tierarztl*, 84:152-156.
- Hollands P (1987). Differentiation of embryonic haematopoietic stem cells from mouse blastocyst growing in vitro. *Development*. 99: 69-76.
- Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Iacono O (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci*, 99:2344-2349.
- Iijama S, Tanimoto Y, Mizuno S, Daitoku Y, Kunita S, Sugiyama F, Yagami K (2010). Effect of different culture conditions on establishment of embryonic stem cells from BALB/cAJ and NZB/BINJ mice. *Cell Reprogram*, 12(6):679-688.
- Islam MK, Tsuji N, Miyoshi T, Alim MA, Huang X, Hatta T, Fujisaki K (2009). The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick bloodfeeding success. *PLoS Pathog*, 5(7):e1000497.
- Jaworski DC (2003). Tick 'talk': protein release by tick salivary cells. *Trends Parasitol*, 19(10):427-429.
- Thomson JA, Itskovitz EJ, Sharipo SS, Vaknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391):1145-1147.
- Kansu E (2006). Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *ANKEM Derg*, 20(ek-2):1-8.
- Kar S, Yilmazer N, Akyildiz G, Gargili A (2017). The human infesting ticks in the city of Istanbul and its vicinity with reference to a new species for Turkey. *Syst Appl Acarol*, 22(12):2245-2255.
- Karaer Z, Yukarı BA, Aydın L (1997). Türkiye Keneleri ve Vektörlükleri. In: *Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektörler*. Ed: A. Özcel, N. Daldal. Türkiye Parazitoloji Derneği, No:13, İzmir, pp:363-433.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292:154-156.
- Kazimírová M, Dovinova I, Rolnikova T, Tothova L, Hunakova L (2006). Antiproliferative activity and apoptotic effect of tick salivary gland extracts on human HeLa cells. *Neuro Endocrinol Lett*, 27(Suppl. 2):48-52.
- Kazimírová M, Štibrániová I (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol*, 3(43).
- Kingston KB, Allen DM, Jacques NA (2002). Role of the C-terminal YG repeats of the primer-dependent streptococcal glucosyltransferase, GtfJ, in binding to dextran and mutan. *Microbiol*, 148:549-558.
- Kramer CD, Poole NM, Coons LB, Cole JA (2011). Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21. *Exp Parasitol*, 127:665-671.

- Leboulle G, Rochez C, Louahed J, Ruti B, Brossard M, Bollen A, Godfroid E (2002) Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg*, 66: 225-233.
- Moore KA, Ema H, Lemischka IR (1997). In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic. *Stem Cells Blood*, 89(12):4337-4347.
- Lieskovska J, Palenikova J, Sirmarova J, Elsterova J, Kotsyfakis M, Campos Chagas A, Calvo E, Uzeki R, Kopecky J (2015). Tick salivary cystatin sialostatin L2 suppresses IFN responses in mouse dendritic cells. *Parasite Immunol*, 37:70-78.
- Lomas LO, Gelman D, Kaufman WR (1998). Ecdysteroid regulation of salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*: A reconciliation of in vivo and in vitro observations. *Gen Comp Endocrinol*, 109(2):200-211.
- Magin TM, McWhir J, Melton DW (1992). A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res*, 20:3795–3796.
- Mans BJ, Gothe R, Neitz AWH (2004). Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. *Parasitol*, 129:95-111.
- Maritz-Oliver C, Louw AL, Neitz AWH (2005). Similar mechanism regulate protein exocytosis from the salivary glands of ixodid and argasid ticks. *J Insect Physiol*, 51:1390-1396.
- Maritz-Olivier C, Stutzer C, Jongejan F, Neitz AWH, Gaspar ARM (2007) Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends Parasitol*, 23(9):397-407.
- Soria B, Roche E, Berna G, Leon Quinto T, Reig JA, Martin F (2000). Insulin secreting cells derived from embryonic stem cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin induced diabetic mice. *Diabetes*, 49:157-162.
- Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:7634-7638.
- Maya-Monteiro CM, Daffre S, Logulloi C, Lara FA, Alves EW, Capurro ML, Zingali R, Almeida IC, Oliveira PL (2000). HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Biological Chem*, 275(47):36584–36589.
- McNally KL, Mitzel DN, Anderson JM, Ribeiro JMC, Valenzuela JG, Myers TG, Godinez A, Wolfenbarger JB, Best SM, Bloom ME (2012). Differential salivary gland transcript expression profile in *Ixodes scapularis* nymphs upon feeding or flavivirus infection. *Ticks Tick Borne Dis*, 3(1):18–26.
- McSwain JL, Essenberg RC, Sauer JR (1982). Protein changes in the salivary glands of the female lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding. *J Parasitol*, 68(1):100-106.
- Hemmati-Brivanlou A, Wright DA, Melton DA (1992). Embryonic expression and functional analysis of a *Xenopus* activin receptor. *Dev Dyn*, 194(1): 1-11.
- Meng GL, Zur Nieden NI, Liu SY, Cormier JT, Kallos MS, Rancourt DE (2008). Properties of murine embryonic stem cells maintained on human foreskin fibroblasts without LIF. *Mol Reprod Dev*, 75:614-622.
- Mimioğlu M (1973). Veteriner ve Tıbbi Artropodoloji. AÜ Vet Fak Yay, AÜ Basımevi, Ankara, p:248.

- Mitalipov S, Wolf D (2009). Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 114: 185–199.
- Graves KH, Moreadith RW (1993). Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, 36:424-33.
- Mudenda L, Pierle SA, Turse JE, Scoles GA, Purvine SO, Nicora CD, Clauss TRW, Ueti MW, Brown WC, Brayton KA (2014). Proteomics informed by transcriptomics identifies novel secreted proteins in *Dermacentor andersoni* saliva. *Int J Parasitol*, 44:1029-1037.
- Narasimhan S, Deponte K, Marcantonio N, Liang X, Royce TE, Nelson KF, Booth CJ, Koski B, Anderson JF, Kantor F, Fikrig E (2007). Immunity against *Ixodes scapularis* salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs *Borrelia* transmission. *PLoS One*, 2:e451.
- Nichols J, Chambers I, Taga T, Smith A (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development*, 128:2333-2339.
- Nunes ET, Mathias MIC, Bechara GH (2006). Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding. *Vet Parasitol*, 140:114-123.
- Oliveira CJF, Sa-Nunes A, Francischetti IM, Carregaro V, Anatriello E, Silva JS, de Miranda Santos IKF, Ribeiro JMC, Ferreira BR (2011). Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *J Biol Chem*, 286(13):10960-10969.
- Onder TT, Daley GQ (2012). New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 22(5):500–508.
- Özcel MA, Daldal N (1997). Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları ve Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, No: 13.
- Beksaç M, Çörtoğlu S, Kansu E, Öztürk M (2004). Kök hücre araştırmalarında güncel kavramlar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları. Sayı:7.
- Patton TG, Dietrich G, Brandt K, Dolan MC, Piesman J, Gilmore Jr RD (2012). Saliva, salivary gland, and hemolymph collection from *Ixodes scapularis* ticks. *J Vis Exp*, 60:e3894.
- Poole NM, Nyindodo-Ogari L, Kramer C, Coons LB, Cole JA (2013). Effects of tick saliva on the migratory and invasive activity of Saos-2 osteosarcoma and MDAMB-231 breast cancer cells. *Ticks Tick-borne Dis*, 4(1-2):120-127.
- Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, Anguita J, Norgard MV, Kantor FS, Anderson JF, Koski RA, Fikrig E (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, 436:573-577.
- Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM (2007). Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem*, 282(40):29256-29263.
- Rolnikova T, Kazimirova M, Buc M (2003). Modulation of human Iymhocyte proliferation by salivary gland extracts of ixodid ticks (Acari:ixodidae) effect of feding stage and sex. *Folia Parasitologica*, 50:305-312.
- Sagsoz H, Ketani M (2008). Kök hücreler. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2):29-33

- Sa-Nunes A, Bafica A, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM, Francischetti IM (2007). Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J Immunol*, 179:1497-1505.
- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell derived inducing activity. *Neuron*, 1(28):31-40.
- Sauer JR, Essenberg RC, Bowman AS (2000). Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *J Insect Physiol*, 46:1069-1078.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Dev Biol*, 95:13726-13731.
- Simons SM, Junior PL, Faria F, Batista IF, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Chudzinski-Tavassi AM (2011). The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. *Biomed Pharmacother*, 65(6):443-450.
- Skallová A, Iezzi G, Ampenberger F, Kopf M, Kopecký J (2008). Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *J Immunol*, 180:6186-6192.
- Smith AG (1991). Culture and differentiation of embryonic stem cells. *J Tissue Cult Methods*, 13:89-94.
- Smith GH, Medina DA (1988). Morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J Cell Sci*, 90:173-183.
- Soares CA, Lima CM, Dolan MC, Piesman J, Beard CB, Zeidner NS (2005). Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Mol Biol*, 14:443-452.
- Sojka D, Franta Z, Horn M, Caffrey CR, Mareš M, Kopáček P (2013). New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends Parasitol*, 29(6):276-285.
- Sonenshine DE (1991). *Biology of Ticks*. Volume:1. Oxford University Press, pp.412.
- Sonenshine DE (1993). *Biology of Ticks*. Volume:2. Oxford University Press, pp.488.
- Sousa ACP, Szabo' MPJ, Oliveira CJF, Silva MJB (2015). Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. *Toxicon*, 102:69-73.
- Sökmensüer LK (2007). Embriyonik kök hücreler ve tedavi amaçlı kullanımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 38:15-9.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336:684-687.
- Stoll P, Bassler N, Hagemeyer CE, Eisenhardt SU, Chen YC, Schmidt R, Schwarz M, Ahrens I, Katagiri Y, Pannen B, Bode C, Peter K (2007). Targeting ligand induced binding sites on GPIIb/IIIa via single-chain antibody allows effective anticoagulation without bleeding time prolongation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(5):1206-1212.
- Takahashi, Kazutoshi et al (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663-676.

- Tamm C, Pijuan Galito S, Anneren C (2013). A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing. *PLoS One*, 8(12).
- Tirloni L, Islam MS, Kim TK, Diedrich JK, Yates JR, Pinto AFM, Mulenga A, You MJ, IDS Vaz Jr (2015). Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. *Parasit Vectors*, 8:338.
- Tirloni L, Reck J, Terra RMS, Martins JR, Mulenga A, Sherman NE, Fox JW, Yates JR, Termignoni C, Pinto AFM, da Silva Vaz I (2014). Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: a comparison between partially and fully engorged females. *PLoS One*, 9(4):e94831.
- Türkşen K (2006). İnsan embriyonik kök hücreleri izolasyon, idame ve farklılaşma (diferensiyasyon). Türk Hematoloji Derneği 9. Mezuniyet Sonrası Eğitim Bursu. 9-15.
- Ural AU (2006). Embriyonel ve mezodermal kök hücreler, Türk Hematoloji Derneği. Erişim adresi: http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/29_04_2006_ali_ugur_ural_10-30_11-00.pdf. Erişim tarihi: 27.06.2008.
- Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem*, 275:18717-18723.
- Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JM (2002). Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol*, 205(Pt18):2843-2864.
- Verfaillie CM, Pera MF, Landsrop PM (2002). Stem cells hype and reality. *Hematology Am Soc Hem Edu Program*, 369-391.
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7:618-630.
- Wikel S (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front Microbiol*, 4:337.
- Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115:281-292.
- Piskorska-Jasiulewicz MM, Witkowska-Zimny M (2015). Perinatal sources of stem cells. *Postepy Hig Med Doswiadczalnej Online*, 69:327-334.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet KOCABAY 01.01.1990 tarihinde Denizli’de doğdu. İlkokulu Hacı Halil Bektaş İlköğretim Okulunda okudu. Ardından orta öğretimine Sevil kaynak Orta Okulunda devam etti. Liseyi Denizli Lisesinde bitirdi. Üniversiteyi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde okudu. Lisans öğrenimi görürken Anadolu Üniversitesi, Açık Öğretim Fakültesi Veteriner Teknikerliği Bölümü’ ne de başlayıp bitirdi. Şu anda çalıştığı aktif kadrosu Koç Üniversitesi, Translasyonel Tıp Araştırma Mekezi (KUTTAM)’ nde bulunmaktadır. 2014-2015 Öğretim yılı, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığım lisansüstü eğitimime devam etmektedir.

