

NKUBAP.00.10.AR.15.10 numaralı proje

**TRAKYA'DAKİ BAZI KENE TÜRLERİNDE
SİTOGENETİK İNCELEMELER**

Yürütücü: Yrd. Doç. Dr. Nadim YILMAZER

2018

TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın gerçekleőmesini sağlayan T.C. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, çalıőmanın kene örneklerini temin eden Doç. Dr. Sırrı KAR'a, laboratuvar çalıőmalarına verdiği desteklerden ötürü Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŐAR ŐİRİN'e ve Doç. Dr. Rifat BİRCAN'a teşekkür ederim.

ÖNSÖZ

T.C. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen “Trakya’daki Bazı Kene Türlerinde Sitogenetik İncelemeler” başlıklı projenin (Proje no: NKUBAP.00.10.AR.15.10) sonuç raporudur.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	2
2.1. Gereç.....	2
2.1.1. Kene örnekleri.....	2
2.1.2. Sitogenetik analizler için kimyasallar.....	2
2.1.3. Flow sitometrik analizler için kimyasallar.....	2
2.2. Yöntem.....	3
2.2.1. Sitogenetik analizler.....	3
2.2.2. Flow sitometrik analizler.....	3
3. BULGULAR.....	7
3.1. Sitogenetik bulgular.....	7
3.2. Flow sitometri bulguları.....	10
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	14
5. KAYNAKLAR.....	16

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. *Hyalomma* cinsi üç tür kenenin genom büyüklüğü verileri13

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. <i>H. excavatum</i> dişi ve erkek örneklerinde PI boyası ile flow sitometri ölçümleri	5
Şekil 2.2. PI floresan sinyallerine ait histogramlar	5
Şekil 3.1. Primer hücre kültürünün ilk kurulduğu ana ait mikrograf	7
Şekil 3.2. a) Kültür kabına tutunmuş hücre (ok). b) Simbiyont mikroorganizmalarla enfekte olmuş kültür besi ortamı	8
Şekil 3.3. Primer hücre kültüründe gözlenen fibroblast benzeri hücreler (kalın ok) ve küresel hücreler (ince ok)	9
Şekil 3.4. İyi yayılmadığı için karyotiplendirilmesi mümkün olmamış metafaz kromozomları	10
Şekil 3.5. Parçalanmış bağırsak ve malpigi tüpleriyle kurulmuş kültürde vakuolizasyon gösteren fibroblast benzeri hücreler	10
Şekil 3.6. <i>H. excavatum</i> türüne ait flow sitometri ölçümleri	11
Şekil 3.7. <i>H. marginatum</i> ve <i>H. detritum</i> türlerinin erkek bireyelerine ait flow sitometri ölçümleri	12
Şekil 3.8. <i>H. marginatum</i> ve <i>H. detritum</i> türlerinin DİŞİ bireyelerine ait flow sitometri ölçümleri	13

ÖZET

Trakya'daki Bazı Kene Türlerinde Sitogenetik İncelemeler

Üç kene türünün, *Hyalomma detritum*, *H. excavatum* ve *H. marginatum*, hücre kültürüne dayalı karyotiplendirilmesini amaçlayan bu çalışmada, primer hücre kültürlerini kurmada başarı sağlanamadığından karyotiplendirme yapılamamış, ancak genom büyüklükleri flow sitometrik olarak ölçülmüştür. *H. detritum*'un dişi ve erkeğinin haploid genom büyüklüğü sırasıyla 1046 Mbp (1.07 pg) ve 861 Mbp (0.88 pg), *H. excavatum*'un 1086 Mbp (1.11 pg) ve 949 Mbp (0.97 pg) ve *H. marginatum*'un 1213 Mbp (1.24 pg) ve 968 Mbp (0.99 pg) olarak bulunmuştur. XX:XO cinsiyet belirleme sistemi bulunan bu kene türlerinde dişi ve erkek genom büyüklüğü arasındaki fark X kromozomunun büyüklüğüne denk geldiğinden, *H. detritum*, *H. excavatum* ve *H. marginatum*'un X kromozomunun sırasıyla 0.19 pg, 0.14 pg ve 0.25 pg DNA içeriğine sahip olduğu anlaşılmıştır.

ABSTRACT

Cytogenetic Investigations on Some Tick Species from Turkish Thrace

In this study aiming karyotyping of three tick species, *Hyalomma detritum*, *H. excavatum* and *H. marginatum*, based on cell culture, karyotyping could not be achieved because of failure in establishing primary cell cultures; however their genom sizes were measured flow cytometrically. The haploid genom sizes of female and male *H. detritum* were found to be 1046 Mbp (1.07 pg) and 861 Mbp (0.88 pg), respectively, while *H. excavatum* 1086 Mbp (1.11 pg) and 949 Mbp (0.97 pg), and *H. marginatum* 1213 Mbp (1.24 pg) and 968 Mbp (0.99 pg), respectively. Since differences in the haploid genom size of the female and male of these ticks which have an XX:XO sex determination system indicate X chromosome size, it is understood that the X chromosome of *H. detritum*, *H. excavatum* and *H. marginatum* may be composed of as much as 0.19 pg, 0.14 pg and 0.25 pg of DNA, respectively.

1. GİRİŞ

Toplum kökenli enfeksiyonların %60'nı zoonotik enfeksiyonlar meydana getirmektedir (Öztürk 2008). Keneler dünya çapında insan hastalıkları açısından sivrisineklerden sonraki ikinci büyük vektör grubudur. Evcil ve yaban hayvanlarında ise hastalık etkenlerinin bir numaralı vektörüdür; bulaştırdıkları hastalıkların yanı sıra kan emdikleri hayvanlarda güç kaybı, verim düşüklüğü, hatta küçük hayvanlarda aşırı anemi dolayısıyla ölümlere yol açar ve bundan dolayı oldukça büyük ekonomik kayıplara neden olur (Jongejan ve Uilenberg 2004, de la Fuente ve ark. 2008, Aktaş 2008). Kentleşme, çevresel kaynakların kullanılması ve açık hava rekreasyonel faaliyetleri insanların kenelerle temas etmesini ve kene kaynaklı patojenlerin bulaşmasını artırır. Ayrıca, iklim değişikliği nedeniyle kene popülasyonları genişlemektedir. Bundan dolayı, yeni ve yeniden ortaya çıkan kene kaynaklı hastalıklar halk sağlığı üzerinde dünya genelinde çok büyük bir etki yaratmaktadır (Estrada-Peña ve ark. 2014, de la Fuente ve ark. 2016).

Türkiye iklimi, yüzey şekli ve bitki örtüsü bakımından, kenelerin biyolojik aktivitelerini sürdürmek için uygun koşullara sahip bir ülkedir; bu nedenle ülkemizde pek çok kene türüne rastlamamız mümkündür (Güler 1982, Güler ve ark. 1993). Türkiye'den bugüne kadar 41 tanesi Ixodidae ve 8 tanesi Argasidae ailesinden olmak üzere toplam 49 kene türü bildirilmiştir (İnci ve ark. 2016, Kar ve ark. 2017, Orkun ve Karaer 2018). Bunlardan *Hyalomma* cinsine ait *H. anatolicum*, *H. detritum*, *H. dromedarii*, *H. excavatum* ve *H. marginatum* gibi türler ülkemiz dahilinde ve yayıldıkları bölgelerde sığır, koyun ve keçilerde tropikal tayleriyoza neden olan bazı *Theileria* türlerinin önemli vektörüdür. Ayrıca sığırlardaki babesioz etkeni olan *Babesia occultans* ve riketsial enfeksiyon etkeni *Rickettsia aeschlimannii* bu kene türleri ile bulaştırılan patojenlerdir (Aktas ve ark. 2014, Bakırcı ve ark. 2015, Keskin ve Bursali 2016, Ribeiro ve ark. 2017). *H. marginatum* Avrupa'da ve ülkemizde Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsünün esas vektörüdür (Vatansever ve ark. 2007) ve *H. excavatum*'a da bu virüsün şüpheli vektörü olarak bakılmaktadır (Ribeiro ve ark. 2017).

Konak bulma, konak üzerinde uzun süre beslenme, kitin sentezi, emilen kanın konsantre edilmesi, hemogloblin sindirimi, hem detoksifikasyonu, vitellogenoz, üreme, yumurtlama, konaktan ayrı uzun süre yaşayabilme, kene-konak-patojen ilişkileri ve pestisitlere direnç geliştirebilme gibi keneye özgü parazitik süreçlerin moleküler ve genetik temelini bilmesi kene ve kene kaynaklı hastalıkların kontrolünün etkili ve çevre dostu bir biçimde sağlanmasında önemli bir çığır açacaktır (de la Fuente ve ark. 2016, Gulia-Nuss ve ark. 2016). Karyotiplendirme, fizik haritalar ile dizi ve bağlantı haritaları kene evrimi ile filogenisinin ve parazitik süreçlerin moleküler ve genetik temelini anlaşılmasında vazgeçilmez araçlardır (Valenzuela ve ark. 2002, Hill ve Wikel 2005, Gulia-Nuss ve ark. 2014). Genom büyüklüğünün belirlenmesi, genomik çalışmalara karar vermede yararlı bir başlangıç noktasıdır, çünkü ne büyüklükte bir genomun dizileneceğinin bilinmesi genom projesinin maliyetinin belirlenmesi için gereklidir (Geraci ve ark. 2007).

Bu çalışmada ülkemizde de insan ve hayvan sağlığı açısından önemli vektörler olan *Hyalomma detritum*, *H. excavatum* ve *H. marginatum*'un karyotiplendirilmesi ve genom büyüklüğünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kene örnekleri

Sitogenetik ve flow sitometrik çalışmalarda Doç. Dr. Sırrı Kar (Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından Trakya'nın çeşitli bölgelerinden sığırlardan toplanarak kolonize edilmiş ve konvansiyonel yöntemler ile tür tayini yapılmış olan *Hyalomma detritum*, *H. excavatum* ve *H. marginatum* türü keneler kullanıldı.

2.1.2. Sitogenetik analizler için kimyasallar

2.1.2.1. Hücre kültürü besi ortamı

Bir litre besi ortamı 13.8 g toz besi ortamı [L-15 Medium (Leibovitz) (L4386 SIGMA), L-glutamin içeren toz besi ortamı] içerecek şekilde hazırlandı. İçerisine 3.7 g sodyum bikarbonat (ChemCruz sc203271A) eklenerek karbondioksit içermeyen etüvde kullanılabilir formülasyon elde edildi. pH 7'ye ayarlandı ve filtre edilerek sterilizasyonu sağlandı. İçerisine 80 mM glukoz (Sigma 16301), %10 triptoz fosfat broth (Sigma T9157), %20 ısıyla inaktive edilmiş fetal sığır serumu (Gibco 10270), 100U/ml penisilin-streptomisin-amfoterisin B (Sigma A5955) ve %1 100mM L-glutamin (Techlabs 609.065-ZL) eklenerek kültür besi ortamı elde edildi.

2.1.2.2. Hipotonik solüsyon

0.075 M KCl (Sigma 12636)

2.1.2.3. Carnoy fiksatif

3:1 oranında metanol (Merck 1754008 447) ve glasiyal asetik asit (Merck K44534763319) karıştırılarak hazırlandı.

2.1.2.4. Tripsin solüsyonu

0.1 g tripsin (Multicell 625-035-EG) ve 0.9 g NaCl (Sigma S-3014) 100 ml çift distile suda çözüldü. pH 7'ye ayarlandı.

2.1.2.5. Giemsa solüsyonu

42.9 ml 0.133 M K₂HPO₄ (Sigma 04243) solüsyonu ve 57.1 ml 0.133 M Na₂HPO₄ (Sigma 04273) solüsyonu karıştırılıp 4 ml'si atıldı. Geriye kalan karışıma 4 ml Giemsa boyası (Merck HX068167) eklenerek %4'lük Giemsa solüsyonu elde edildi.

2.1.3. Flow sitometrik analizler için kimyasallar

2.1.3.1. Galbraith tamponu

4.26 g MgCl₂ (21mM), 8.84 g sodyum sitrat (30mM), 4.2 g 3-[N-morfolino] propan sülfonik asit ("MOPS") (18mM), 1 ml triton X-100 ve 1 mg kaynatılmış ribonükleaz A 1 L çift distile suda çözüldü. pH 7.2'ye ayarlandı, 0.22 µm filtreden süzüldü ve 4°C'de kullanılana kadar saklandı.

2.1.3.2. Propidyum iyodür (PI) boyası

25 mg PI, 5 ml çift distile suda çözüldü.

2.1.3.3. PI çalışma solüsyonu (0.5mg/ml)

5 ml (5mg/ml) PI boyası 45 ml Dulbecco's PBS ile 0.1 mg/ml'ye seyreltildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Sitogenetik analizler

2.2.1.1. Örneklerin hazırlanması

2.2.1.2. Yumurta (embriyo) dezenfeksiyonu ve ekim

Kene embriyonik hücre kültürü oluşturmak için yumurtalar önce dezenfeksiyon işleminden geçirildi. Bunun için yumurtalar 10 mm plastik petri kabı (Sarstedt 83.3902) içerisinde iki defa %70'lik etanol ile yıkandı. Beş dakika tween 20 (Biomatik Corporation 9005-64-5) içeren %70'lik etanol içerisinde bekletildi (10 ml %70 etanol içerisine 50 µl tween 20 eklenerek hazırlandı). İki defa deiyonize su ile yıkandıktan sonra HBSS (Hanks' balanced salt solution, Sigma H9269) içerisine alındı. Bu aşamadan sonra yumurtaların parçalanması ve embriyonik hücrelerin birbirinden ayrılması için HBSS içerisindeki yumurtalar steril cam baget ile ezilerek parçalandı. Tüm yumurtaların parçalanması ile elde edilen lizat 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı. 1200 rpm hızda 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Dökelti uzaklaştırıldı ve çökelti üzerine 33°C'ye önceden ısıtılmış 5 ml taze besi yeri eklendi. Çözelti haline gelen çökelti T25 flaklara alındı ve inkübasyona bırakıldı. Tüm kene türlerinde inkübasyon için etüv 33°C'ye ayarlandı.

2.2.1.3. Metafazların elde edilmesi

Kültüre veya hücre süspansiyonu üzerine 50 µl kolşisin solüsyonu ilave edilip karıştırıldı. 1.5 saat süreyle 33°C etüvde inkübe edildi. Süre sonunda kültür tüpündeki materyal dibi konik cam santrifüj tüpüne aktarıldı. 1500 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı, çökelti cam pastör pipeti ile karıştırıldı. Üzerine 8 ml hipotonik solüsyonu (0.075 M KCl) eklendi. 33°C etüvde 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 1500 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı, çökelti cam pastör pipeti ile karıştırıldı ve üzerine 5 ml yeni hazırlanmış Carnoy fiksatif (3:1 oranında metanol:glasiyal asetik asit) eklendi. 1500 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Carnoy fiksatif ile yıkama aşaması üç defa tekrarlandı.

2.2.1.4. Yayma preparat

Son santrifüj işlemi takiben tüpün dibinde çökelti ve 0.5 ml fiksatif kalacak şekilde dökelti atıldı. Çökelti iyice karıştırıldı ve çökeltiden bir damla nefesle yüzeyi nemlendirilmiş lamlara damlatılarak homojen bir şekilde yayılması sağlandı. Yayma preparatlar 37°C etüvde 3 gün süre ile yaşlanmaya bırakıldı.

2.2.1.5. Bantlama

Yaşlandırılmış preparatlar 1-2 dakika tripsin solüsyonu ile muamele edildi, sonra akan musluk suyu altında yıkandı. 5-6 dakika %4'lük Giemsa solüsyonunda bekletildi. Boyanmış preparatlar akan musluk suyu altında yıkandı, kurutma kağıdı arasında kurutuldu ve mikroskopta kontrol edildi.

2.2.2. Flow sitometrik analizler

2.2.2.1. Örneklerin hazırlanması

2.2.2.2. Ergin bireylerden örneklerin hazırlanışı

Kenelerden hücre nükleuslarının eldesi Desalle ve ark. (2005)'nin geliştirmiş olduğu metodun değiştirilmiş şekli kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla mikrocerrahi seti kullanılarak dişi ve erkek keneler stereo mikroskop altında ayrı ayrı disekte edildi. Her bir tür için her bir tüpe aynı cinsiyete ait üç keneden disekte edilen synganglia ve tükürük bezi dokuları alındı. Bir ml Galbraith tamponunda hücreler ezildi (Galbraith ve ark. 1983). Daha sonra hücre lizatı 40 µm naylon filtrelerden süzüldü ve PI boyama için hücre nükleus süspansiyonları elde edildi.

2.2.2.3. Larvalardan örneklerin hazırlanışı

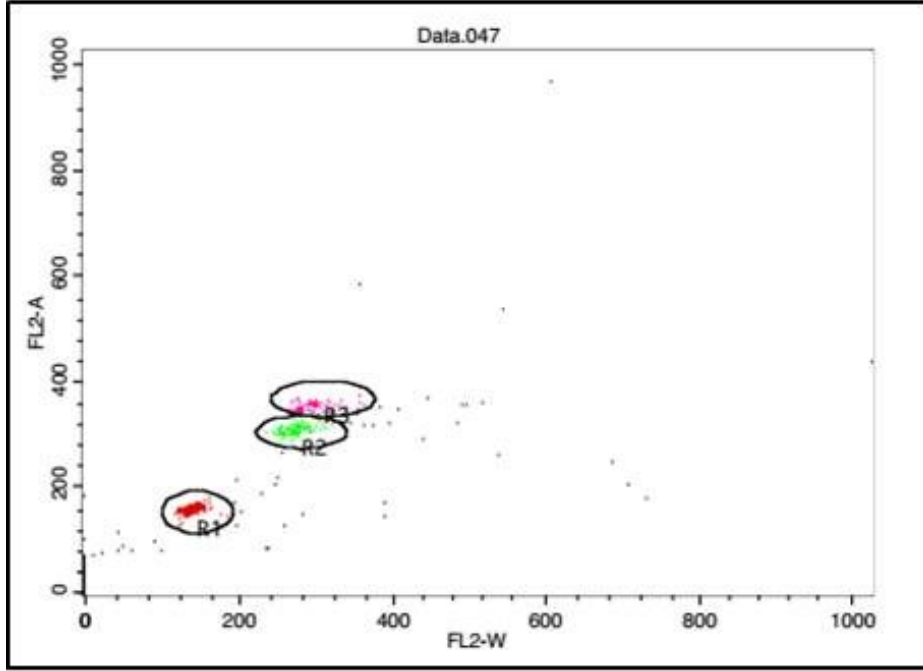
H. excavatum türüne ait kene larvalarında nükleus preparatlarının hazırlanması için larvalar soğuk porselen havan içerisinde 1 ml Galbraith tamponu kullanılarak ezildi. Daha sonra hücre lizatı 40 µm naylon filtrelerden süzüldü. Elde edilen nükleus süspansiyonu PI boyama için 1:10 oranında Galbraith tamponu ile seyreltilti.

2.2.2.4. Propidyum iyodür (PI) ile örneklerin boyanması

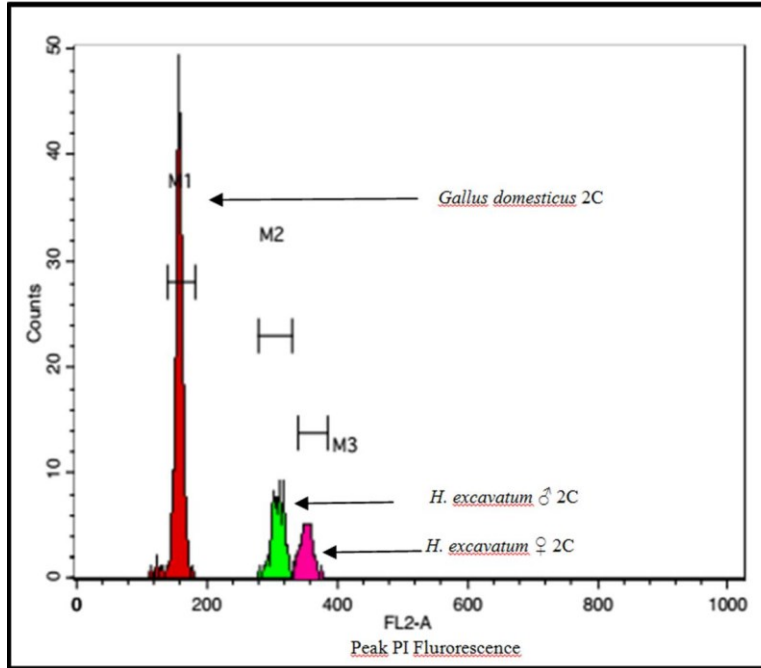
Nükleus preparatları PI ile boyanmadan önce, genom büyüklüğünün hesaplanmasında standart olarak kullanılan *Gallus domesticus* (tavuk) kırmızı kan hücre süspansiyonu bir tüpte yaklaşık 1.5×10^6 son konsantrasyon olacak şekilde hazırlandı ve örnek tüpleri içerisine de internal kontrol olarak aynı *Gallus domesticus* kırmızı kan hücre süspansiyonu eklendi. Daha sonra örneklerin üzerine hazırlanan PI çalışma solüsyonundan 100 µl (75 µM) PI boyası eklendi. Örnekler yaklaşık 30 dakika 4°C'de karanlık bir ortamda PI boyanma işlemi için bekletildi.

2.2.2.5. Flow sitometrik ölçümler

Hazırlanan nükleus süspansiyonları BD FACS Calibur flow sitometri cihazında (BD Biosciences, USA) 488 nm 20 mW eksitasyon output (çıkışına) ayarlı argon-iyon lazer kullanılarak analiz edildi. Eksite edilmiş (uyarılmış) materyalden PI Floresan lazer emisyonu 623 nm dalga boyunda 20 nm spektral bantta ayarlanmış bir foto multiplikator kullanılarak kaydedildi. Elde edilen verilerde sapmaları engellemek için dışarda kalan forward ve side scatter sinyalleri kapılama (gating) işlemi uygulandı (Şekil 2.1). Histogramların oluşturulması için partiküler düzeyde PI ışımaya olguları kullanıldı (Şekil 2.2). Genomik büyüklük hesaplaması için 2C *Gallus domesticus* kırmızı kan hücre süspansiyonu ve kene nükleus süspansiyonlarına ait histogramlarda medyan ışımaya sinyalleri ayrı ayrı kapılar (gate) alınarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için, ortalama olarak 30.000 nükleus sayıldı. Tüm bu işlemler BD CellQuest™ yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 2.1. *H. excavatum* dişi ve erkek örneklerinde PI boyası ile flow sitometri ölçümleri. R1 kapılanmış *Gallus domesticus* kırmızı kan hücre nükleus sinyallerini, R2 kapılanmış *H. excavatum* erkek bireylere ait nükleus sinyallerini, R3 ise kapılanmış *H. excavatum* dişi bireylere ait nükleus sinyallerini göstermektedir.



Şekil 2.2. PI floresan sinyallerine ait histogramlar. Kırmızı renkli histogram *Gallus domesticus*'a ait 2C (diploid) genomu, yeşil renkli histogram *H. excavatum* erkek bireylere ait 2C genomu ve pembe histogram *H. excavatum* dişi bireylere ait 2C genomu göstermektedir.

2.2.2.6. Genom büyüklüğünün hesaplanması

Genom büyüklüğünün hesaplanmasında standart olarak kullanılan *Gallus domesticus* kırmızı kan hücrelerine ait 2C (diploid) genom değeri daha önce yapılan

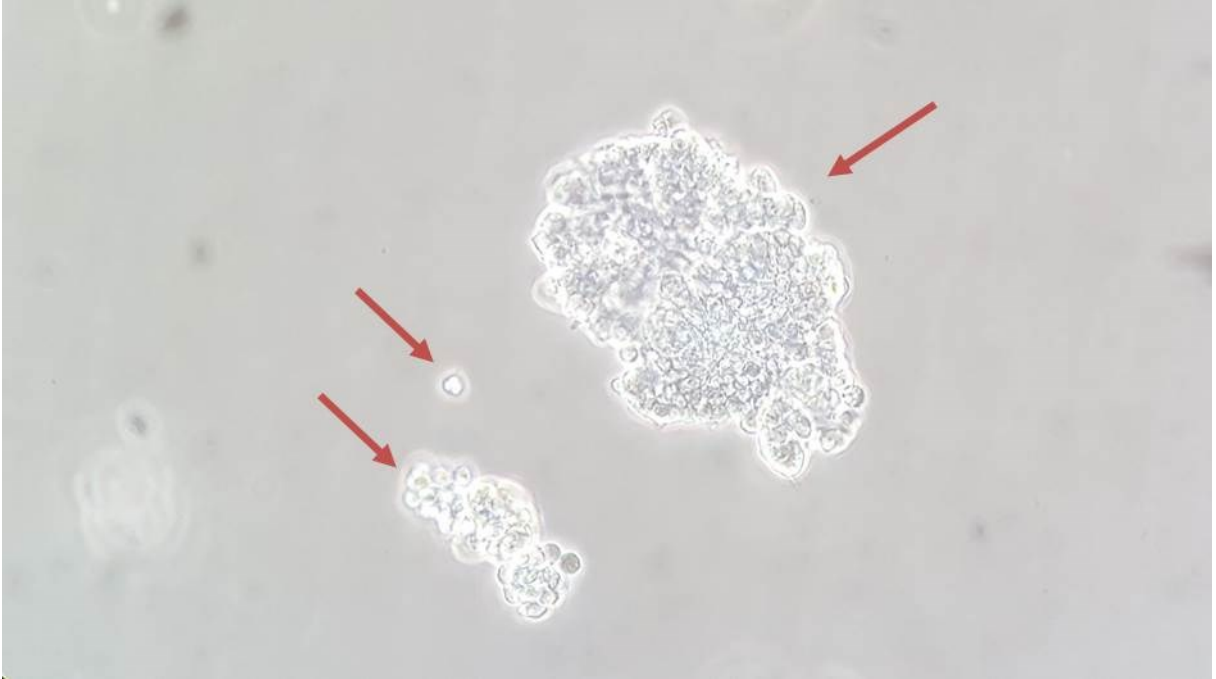
çalışmalarda 2.33 pg DNA olarak belirlenmiştir (Geraci ve ark. 2007). Ayrıca, 1 pg DNA 0.978×10^9 baz çiftine karşılık gelmektedir.

Yapılan bu çalışmada, genom büyüklüğünün saptanmasında Dolezel ve ark. (2003)'ün tanımladığı dönüşüm formülü kullanıldı. Genom büyüklüğü $(GS)_{\text{bilinmeyen}} = GS_{\text{standart}} \times \text{PI-Flour}_{\text{bilinmeyen}} / \text{PI-flour}_{\text{standart}}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

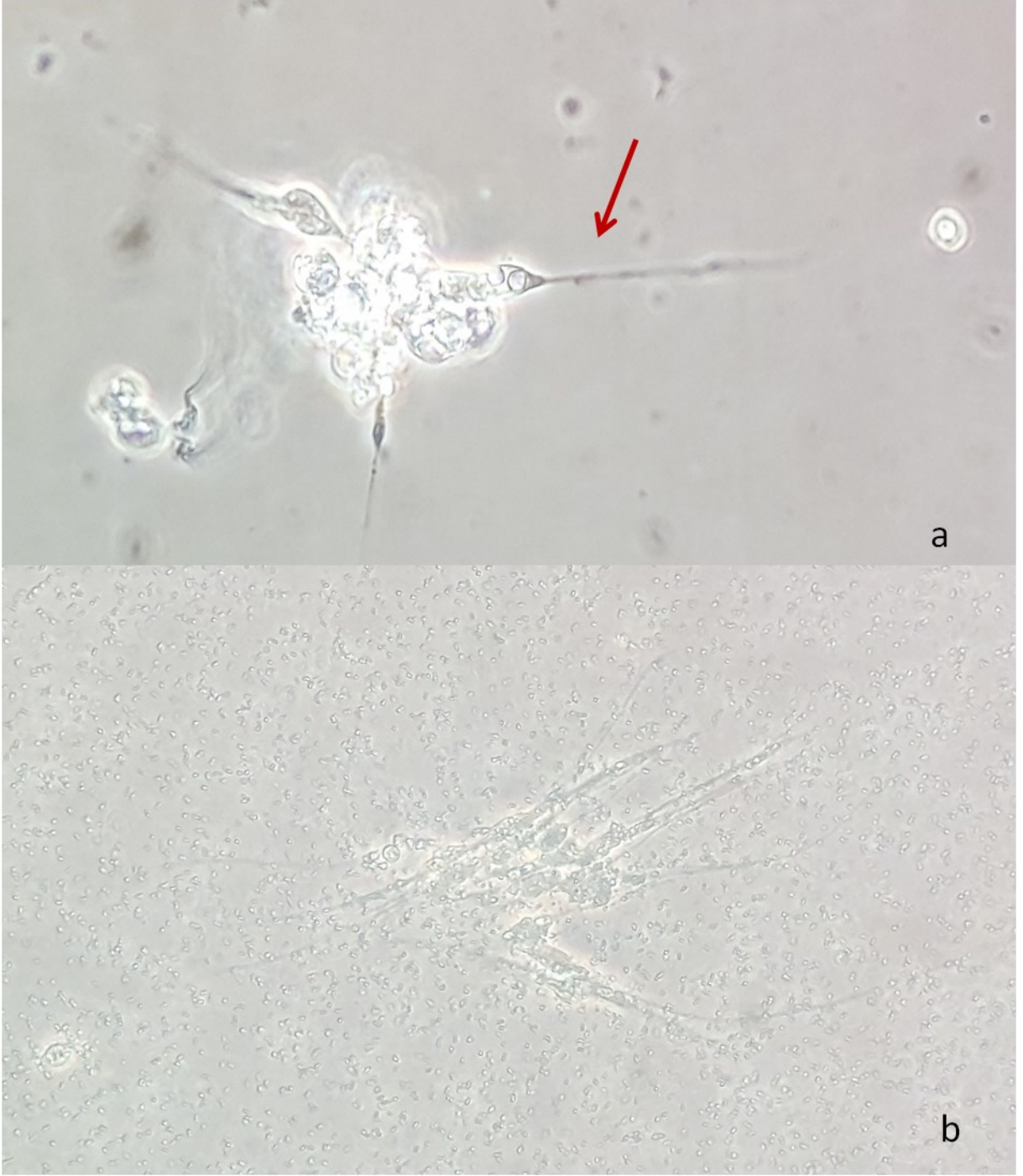
3. BULGULAR

3.1. Sitogenetik bulgular

Hücre ekiminin hemen sonrasında kültürde canlı embriyonik hücre ve hücre kümelerinin varlığı gözlenmiştir (Şekil 3.1). Primer kültürde hücrelerin tutunmaya ve çoğalmaya başladığı gözlenmiştir. Ancak yumurtaların parçalanması ile beraber bazı türlerde daha yoğun olmakla beraber tüm yumurtalarda bulunan endosimbiyont mikroorganizmalar kültür ortamına dağılmıştır. Bu mikroorganizmaların varlığı besi ortamındaki nütrientlerin çok hızlı tükenmesine ve ortamın asitliğinin hızla artmasına neden olmuştur. Şekil 3.2a'da tutunan ve çoğalmaya başlayan embriyonik hücreler gözlenmektedir. Şekil 3.2b'de ise yaygın simbiyont mikroorganizma kontaminasyonu gözlenmektedir.



Şekil 3.1. Primer hücre kültürünün ilk kurulduğu ana ait mikrograf. Canlı hücreler ve hücre kümeleri oklarla gösterilmiştir.



Şekil 3.2. a) Kültür kabına tutunmuş hücre (ok). b) Simbiyont mikroorganizmalarla enfekte olmuş kültür besi ortamı.

Kültür aşamasının başında karşılaşılan bu problemi çözmek amacı ile kültürler yüksek dozda antibiyotik ve antifungal içeren besi ortamı ile yıkanmıştır. Ancak *in vitro* koşullarda bölünme hızı zaten düşük olan bu hücrelerin antibiyotiğin artan dozlarına karşı çok hassas olduğu gözlenmiştir. Yüksek doz antibiyotik ve antifungal içeren besi ortamı ile yıkanan kültürlerde az sayıda tutunan hücreler de hızla yıkıma uğramışlardır. Şekil 3.3'te de görüldüğü şekilde, her üç türe ait kültürde hücrelerde büyük vakuoller oluşmuş ve hücreler ölüme gitmiştir.



Şekil 3.3. Primer hücre kültüründe gözlenen fibroblast benzeri hücreler (kalın ok) ve küresel hücreler (ince ok). Hücrelerdeki vakuolizasyon belirgin şekilde gözlenmektedir.

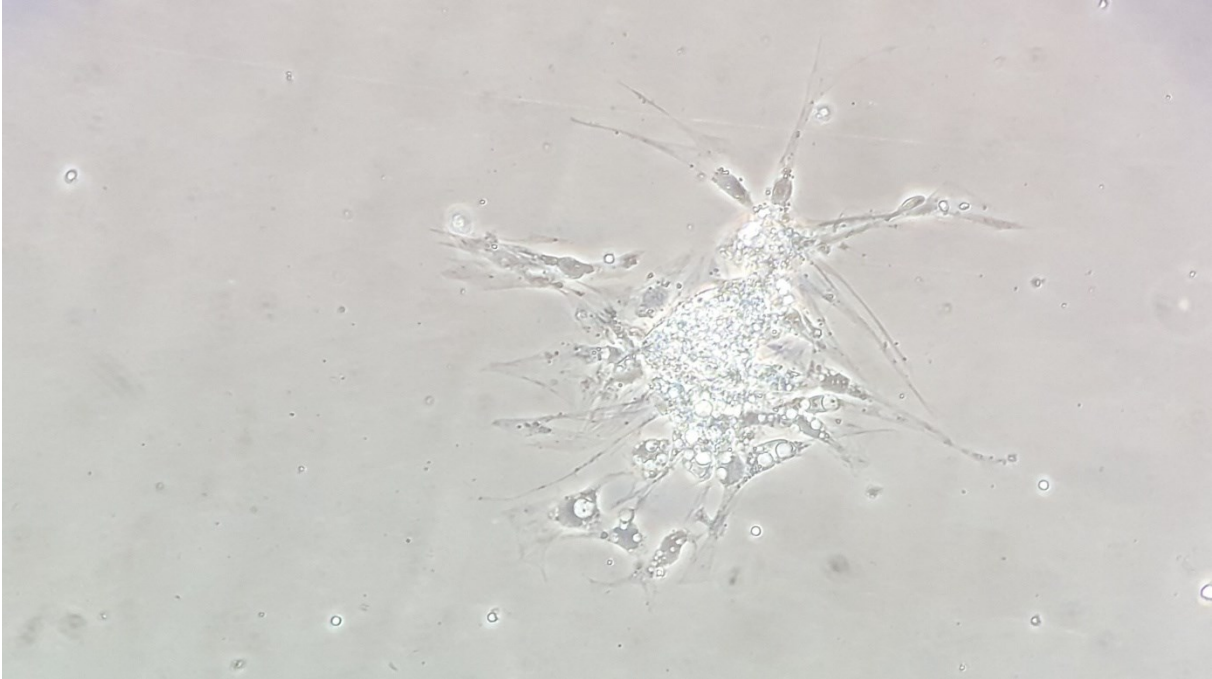
Hücre kültürlerinden kromozom eldesi dolayısı ile sitogenetik analiz yapılabilmesi için hücre kültürlerinin T25 flaskın en az %60'ını kaplaması ve yüksek mitotik indeks gerekmektedir. Simbiyont bakteri baskısı nedeni ile kurulan kültürlerin hiçbirinde bu yoğunlukta hücre elde edilememiştir.

Yumurtadaki spontan metafaz sıklığını gözlemek ve mümkün olursa doğrudan yumurtadan sitogenetik analiz yapmak için de denemeler gerçekleştirilmiştir. Yumurtalar baştaki dezenfeksiyon ve parçalama işlemini takiben ekim yapılmadan doğrudan kolşisin ile muamele edilerek spontan metafazların eldesi sağlanmıştır. Daha sonra yayma preparatlar hazırlanmış ve G-bantlama işlemleri uygulanmıştır. Bu yöntemle yumurtalardan çok az sayıdaki metafaz elde edilmiştir. Ancak bu metafazların kalitesi de sitogenetik analiz yapmak için yeterli olmamıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İyi yayılmadığı için karyotiplendirilmesi mümkün olmamış metafaz kromozomları.

Son olarak bağırsak ve malpigi tüplerinden doku kültürü kurulmaya çalışılmıştır. Erişkin kenelerden alınan dokular besi ortamı içerisinde bistüri kullanılarak parçalanmıştır. Elde edilen doku parçaları ile ekim yapılmıştır. Bu şekilde oluşturulan kültürlerde hücreler ilk başta tutunmuş (Şekil 3.5), ancak çok kısa süre sonra ölmeye başlamıştır. Embriyonik hücre kültürü için formülize edilen besi ortamı erişkin kenelerin hücrelerinin çoğalmasını destekleyememiştir.

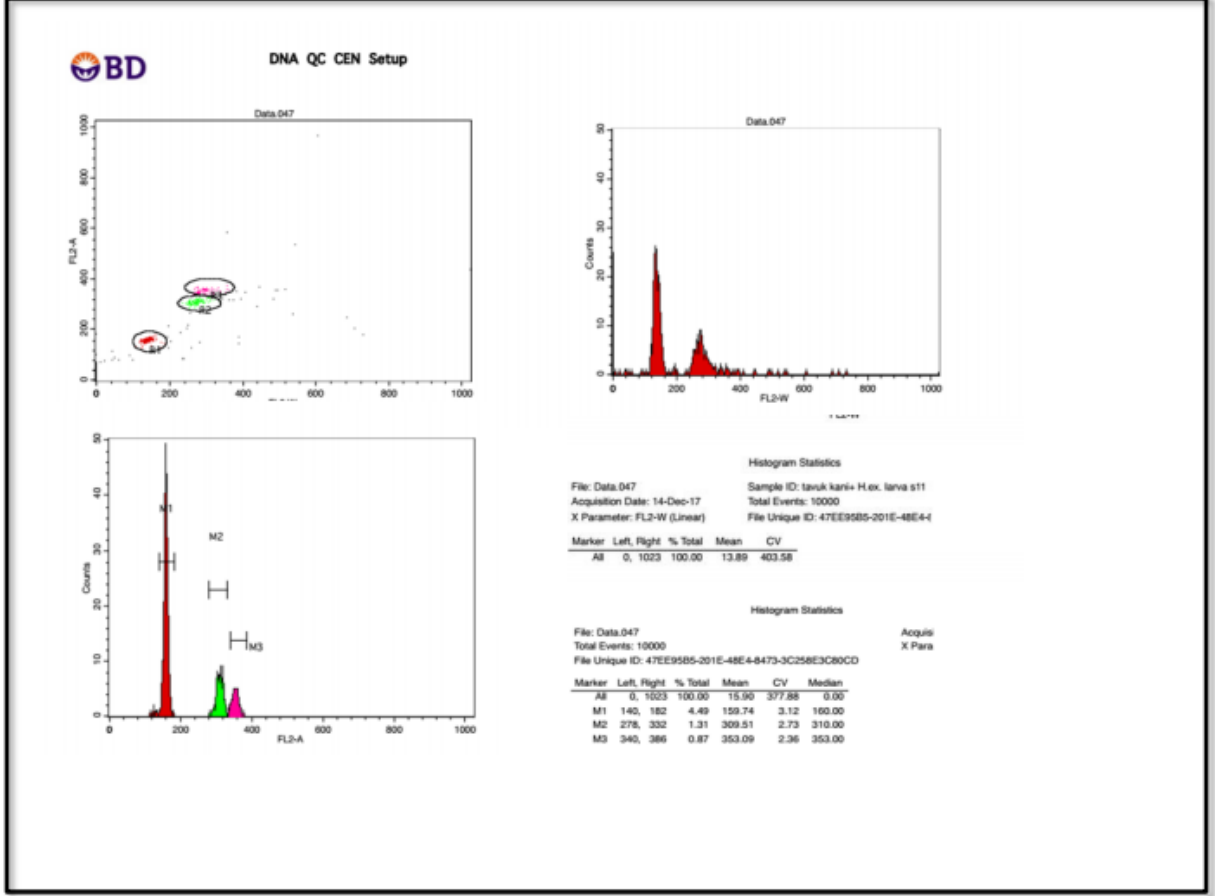


Şekil 3.5. Parçalanmış bağırsak ve malpigi tüpleriyle kurulmuş kültürde vakuolizasyon gösteren fibroblast benzeri hücreler.

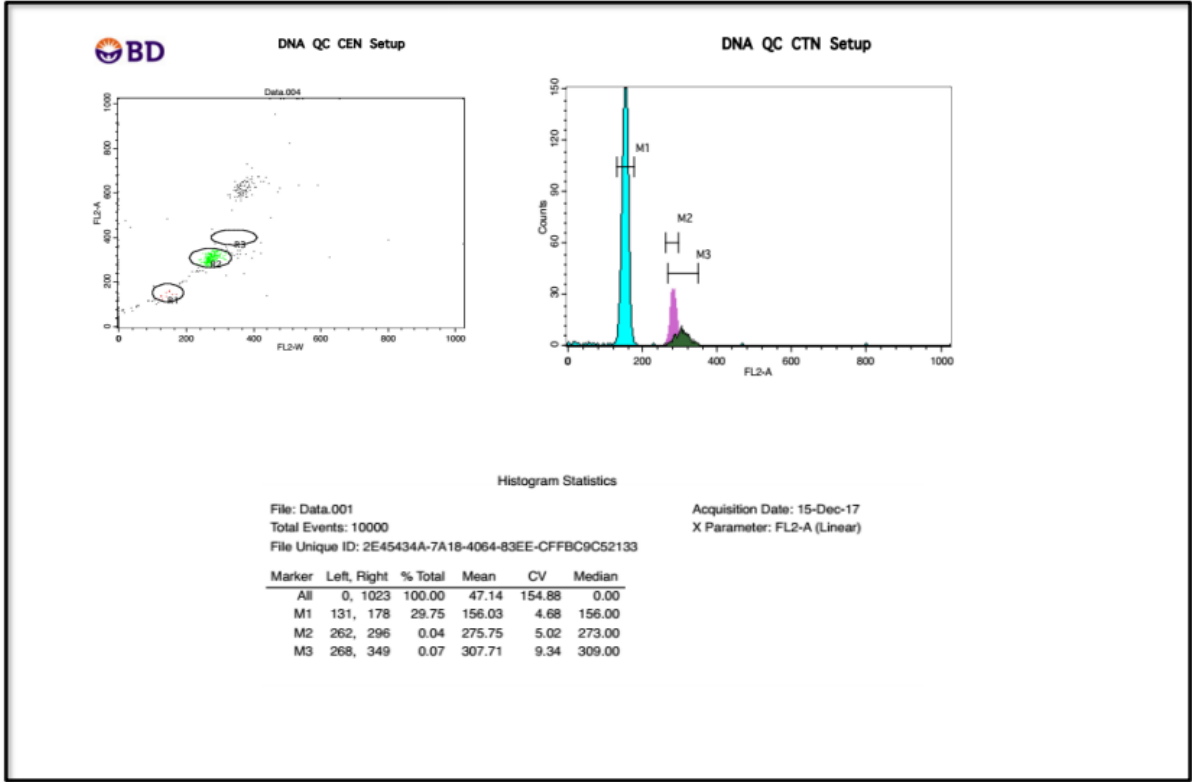
3.2. Flow sitometri bulguları

Her bir türün erişkin dişi ve erkekinden üçer tane olmak üzere toplam 18 kenede flow sitometrik ölçümler yapılmıştır. Ölçümler üçerli havuzlar şeklinde yapılmıştır. *Hyalomma excavatum*' a ait flow sitometri sonucu Şekil 3.6'de, *H.*

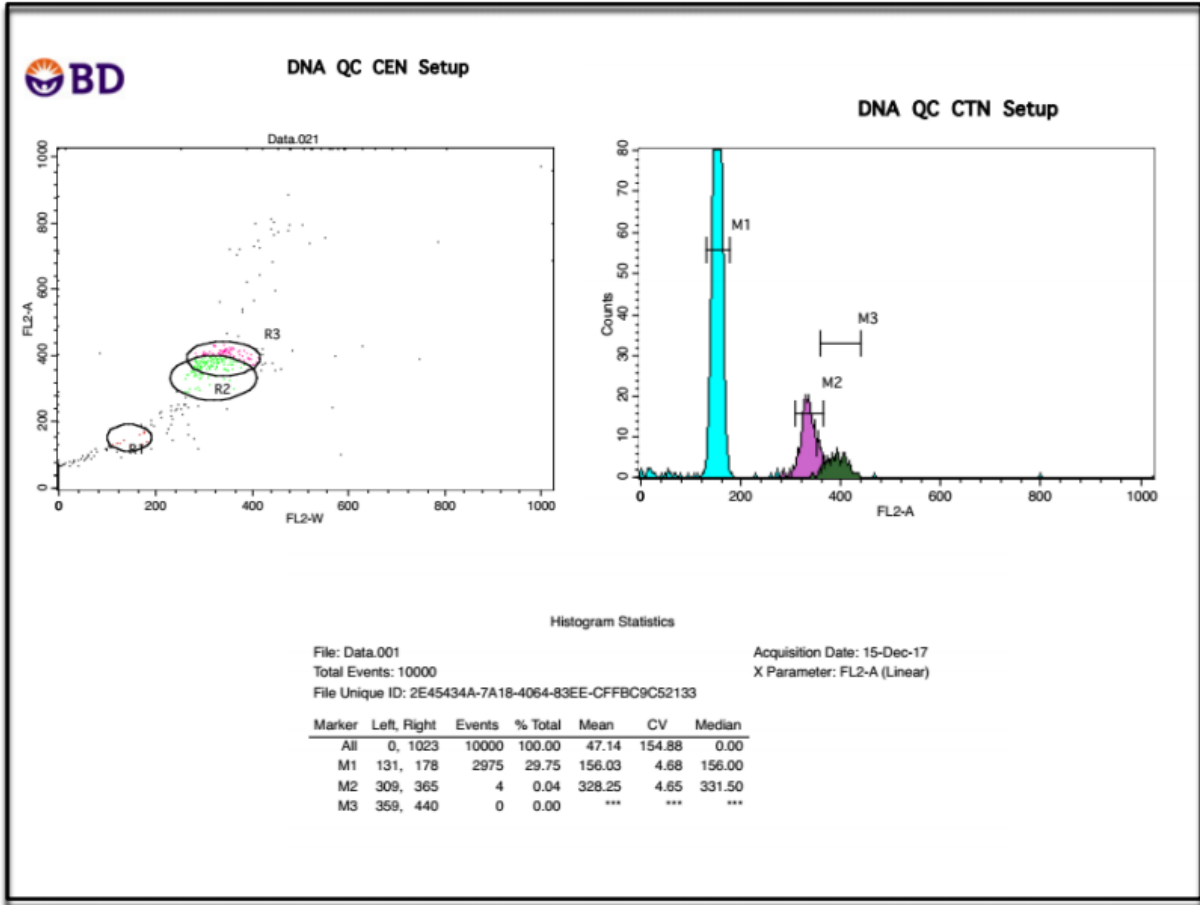
marginatum'a ait flow sitometri sonucu Şekil 3.7'de ve *H. detritum*'a ait flow sitometri sonucu Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Flow sitometrik ölçümlerden hesaplanan ortalama genom büyüklükleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.6. *H. excavatum* türüne ait flow sitometri ölçümleri. M1: *Gallus domesticus*; M2: *H. excavatum* erkek bireyler; M3: *H. excavatum* dişi bireyler.



Şekil 3.7. *H. marginatum* ve *H. detritum* türlerinin erkek bireylerine ait flow sitometri ölçümleri. M1: *Gallus domesticus*; M2: *H. detritum* erkek bireyler; M3: *H. marginatum* erkek bireyler.



Şekil 3.8. *H. marginatum* ve *H. detritum* türlerinin dişi bireylerine ait flow sitometri ölçümleri. M1: *Gallus domesticus*; M2: *H. detritum* dişi bireyler; M3: *H. marginatum* dişi bireyler.

Tablo 3.1. *Hyalomma* cinsi üç tür kenenin genom büyüklüğü verileri.

Tür	2C GB pg (DNA)	1C GB pg (DNA)	1C GB (Mbç)
<i>H. detritum</i> ♂	1.75	0.88	861
<i>H. detritum</i> ♀	2.13	1.07	1046
<i>H. excavatum</i> ♂	1.94	0.97	949
<i>H. excavatum</i> ♀	2.21	1.11	1086
<i>H. marginatum</i> ♂	1.98	0.99	968
<i>H. marginatum</i> ♀	2.48	1.24	1213

2C: Diploid genom, 1C: Haploid genom, GB: Genom büyüklüğü, pg: Pikogram, Mbç: Mega baz çifti.

Hyalomma cinsi kenelerde haploid genom büyüklüğü karşılaştırıldığında, *H. marginatum* türü kenelerin en büyük genoma sahip olduğu, *H. detritum* türü kenelerin ise araştırılan türler içinde en küçük genom büyüklüğüne sahip olduğu görülmektedir. Bununla beraber, *H. excavatum* ile *H. marginatum* genom büyüklüğünün erkek bireylerde; *H. detritum* ile *H. excavatum* genom büyüklüğünün dişi bireylerde birbirine yakın olduğu göze çarpmaktadır.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kene hücre kültürlerinin kurulması zaman gerektiren, zahmetli, sabır ve el becerisi isteyen bir iştir. İlk sürekli kene hücre kültürünün kurulması 30 yıldan fazla bir zaman almıştır. Günümüzde de primer kültürden sürekli kültür oluşturulması 5 yılı bulabilmektedir ve başarı oranı oldukça düşüktür (Bell-Sakyi ve ark. 2007). 1970'li yıllarda başlayan kene hücre kültürü çalışmalarında (Bell-Sakyi ve Attoui 2016) bugüne kadar 16 kene türünden 57 sürekli hücre hattı elde edilmiştir (Bell-Sakyi ve ark. 2012). Bu 16 kene türünden bir tanesi *Hyalomma anatolicum*'dur, ancak bizim çalıştığımız *Hyalomma* türlerinin hücre kültürlerinin oluşturulmasıyla ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Primer hücre ve doku kültüründe gözlemediğimiz besi ortamında yüzen hücre kümeleri, vakuollü fibroblast benzeri hücreler ve küresel hücreler, endosimbiyont riketsia varlığı, hücre bölünmesinin olmayışı veya durması ve hücre ölümü gibi özellikler başka araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda da görülmüştür (Bell-Sakyi 1991, Chen ve ark. 1994, Bell-Sakyi ve ark. 2009, Lim ve ark. 2017). Bu çalışmada da hücre bölünmesinin olmayışı veya durması, hücre ölümü ve riketsia benzeri mikroorganizma enfeksiyonu nedeniyle hücre kültürü kurma çalışmaları proje süresinin sınırlı olması nedeniyle sonlandırılmıştır.

Feulgen densitometri, reasosiasyon kinetiği ve flow sitometri genom büyüklüğünün belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir. Flow sitometri hızlı sonuç alınması, daha kesin sonuç vermesi ve az hücre materyal gerektirmesi nedeniyle diğer yöntemlere göre üstündür (Geraci ve ark. 2007, Nene 2009) ve yapılan çalışmalar flow sitometri ile elde edilen C değeri tahminlerinin, tüm genom dizilemesi ile elde edilen C değerleri ile daha uyumlu olduğunu, reasosiasyon kinetiğinin genom büyüklüğünü flow sitometriye göre daha düşük tespit ettiğini göstermiştir (Bennett 2003, Dolezel ve Bartos 2005). Bugüne kadar, reasosiasyon kinetiği ile *Amblyomma americanum* (1.04 Gbç=Giga baz çifti) (Palmer ve ark. 1994), *Ixodes scapularis* (2.1 Gbç) ve *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*'un (7.1 Gbç) (Ullmann ve ark. 2005), flow sitometri ile *Amblyomma americanum* (3.11 Gbç), *A. cajennense* (2.78 Gbç), *A. maculatum* (2.95 Gbç), *Argas brevipes* (1.47 Gbç), *Dermacentor andersoni* (2.74 Gbç), *D. variabilis* (2.86 Gbç), *Ixodes pacificus* (1.99 Gbç), *I. scapularis* (2.26 Gbç) ve *Ornithodoros turicata*'nın (1.09 Gbç) genom büyüklüğü belirlenmiştir (Geraci ve ark. 2007) (Bu genom büyüklüğü değerleri dişi ve erkek genom büyüklüğü ortalamalarıdır.). *Hyalomma detritum*, *H. excavatum* ve *H. marginatum*'un genom büyüklüğü ilk kez bu çalışma ile flow sitometrik olarak ölçülmüş olup bu türlerin genom büyüklüğü *Ornithodoros turicata*'nın genom büyüklüğü civarındadır.

Kahn (1964) *Hyalomma dromedarii*, *H. marginatum*, *H. excavatum* ve *H. rufipes*'in karyotip açısından birbirinden ayırt edilemediğini, *Dermacentor andersoni*'nin karyotip analizinin *Hyalomma* türleri ile ayırlamayacak kadar çok

benzer olduğunu bildirmiştir. *Dermacentor andersoni* de sitogenetik olarak *D. variabilis*'e çok benzerdir (Gunn ve Hilburn 1990). Bu durumda, kromozom kondensasyonundaki farklılıklar bu türlerin genom büyüklüklerindeki farkı karyotipe yansıtmıyor olabilir. *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus microplus* ve *Amblyomma americanum* genomunun önemli bir yüzdesinin çok sayıda tekrarlı DNA'dan ibaret olduğu (Palmer ve ark. 1994, Van Zee ve ark. 2007, Meyer ve ark. 2010) ve ixodid kenelerde tekrarlı DNA miktarının ve organizasyonunun oldukça varyasyon gösterdiği (Ullmann ve ark. 2005), genom büyüklüğünün tür içinde dahi değişiklik gösterebildiği bilinmektedir (Nene 2009). Çalışmamızda, *Hyalomma detritum*, *H. excavatum* ve *H. marginatum* genomlarının büyüklüğündeki farkların nedeni tekrarlı DNA'daki kopya sayılarındaki fark olabilir.

Hyalomma detritum, *H. excavatum* ve *H. marginatum* XX:XO cinsiyet belirleme sistemine sahiptir ve her üç türün de dişileri 22 (20 otozom ve 2 gonozom), erkekleri 21 (20 otozom ve 1 gonozom) kromozom taşır (Oliver 1977). Bu nedenle, dişi ve erkek arasındaki genom büyüklüğü farkı X kromozomunun DNA içeriğini yansıtmakta olup, bu *Hyalomma detritum*'un 0.19 pg, *H. excavatum*'un 0.14 pg ve *H. marginatum*'un 0.25 pg'lık X kromozomuna sahip olduğu anlamına gelir. Tüm genom büyüklüğü ile kıyaslandığında X kromozomunun otozomlara göre çok büyük olduğu anlaşılmaktadır. Bu çıkarım, sitogenetiği incelenmiş olan kenelerde X kromozomunun en büyük kromozom olduğunu göstermiş olan Oliver (1977) ve Chen ve ark. (1994)'nin bulgularıyla desteklenebilir.

Ixodes scapularis'in genom dizilemesi tamamlanmış (Mansfield 2017) ve oldukça büyük bir genoma sahip olan *Rhipicephalus microplus*'un genom dizilemesinin yapılması önerilmiştir (Meyer ve ark. 2010). Çalışmamız *Hyalomma detritum*, *H. excavatum* ve *H. marginatum* türlerinin bugüne kadar çalışılmış diğer kene türlerine göre daha küçük bir genoma sahip olduğunu göstermiştir. Hem insan hem de hayvan sağlığı açısından önemleri göz önüne alındığında, kene-konak-patojen ilişkilerinin genetik ve moleküler temelini ortaya çıkarmak için araştırmış olduğumuz türlerin genom dizilemelerinin yapılması daha az maliyetli olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- Aktaş M (2008). Kenelerde biyoloji. Dr. Mustafa Aydın Çevik Anısına II.Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu Kene Kaynaklı Enfeksiyonlar, Bildiri Kitabı, 21-25, Ankara.
- Aktas M, Vatansever Z, Ozubek S (2014). Molecular evidence for trans-stadial and transovarial transmission of *Babesia occultans* in *Hyalomma marginatum* and *Rhipicephalus turanicus* in Turkey. *Vet Parasitol*, 204(3-4): 369-371.
- Bakırcı S, Bilgiç HB, Hacılarlıoğlu S, Ünlü AH, Köse O, Aksulu A, Eren H, Karagengeç T (2015). Laboratuvar şartlarında *Hyalomma excavatum*'un üretilmesi ve kolonizasyonu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62: 99-104
- Bell-Sakıy L (1991). Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *J Parasitol*, 77(6): 1006-1008.
- Bell-Sakıy L, Zwegarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F (2007). Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol*, 23: 450-457.
- Bell-Sakıy L, Ružek D, Gould EA (2009). Cell lines from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Exp Appl Acarol*, 49: 209-219.
- Bell-Sakıy L, Kohl A, Bente DA, Fazakerley JK (2012). Tick Cell Lines for Study of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Other Arboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(9): 769-781.
- Bell-Sakıy L, Attoui H (2016). Virus Discovery Using Tick Cell Lines. *Evol Bioinform Online*, 12(Suppl 2): 31-34.
- Bennett MD, Leitch IJ, Price HJ, Johnston JS (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157Mb and thus ~25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~125 Mb. *Ann Bot*, 91: 547-557.
- Chen C, Munderloh UG, Kurtti TJ (1994). Cytogenetic characteristics of cell lines from *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, 31(3): 425-434.
- de la Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE (2008). Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci*, 13: 6938-6946.
- de la Fuente J, Waterhouse RM, Sonenshine DE, Roe RM, Ribeiro JM, Sattelle DB, Hill CA (2016). Tick Genome Assembled: New Opportunities for Research on Tick-Host-Pathogen Interactions. *Front Cell Infect Microbiol*, 6: 103.
- DeSalle R, Gregory TR, Jahnsen JS (2005). Preparation of samples for comparative studies of arthropod chromosomes: visualization, in situ hybridization, and genome size estimation. *Methods Enzymol*, 395: 460-488.

- Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A*, 51: 127-128.
- Dolezel J, Bartos J (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot*, 95: 99-110.
- Estrada-Peña A, Ostfeld RS, Peterson AT, Poulin R, de la Fuente J (2014). Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. *Trends Parasitol*, 30: 205-214.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayers NM, Sharma DP, Firoozabady E (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049-1051.
- Geraci NS, Johnston JS, Robinson JP, Wikel SK, Hill CA (2007). Variation in genome size of argasid and ixodid ticks. *Insect Biochem Mol Biol*, 37(5):399-408.
- Gulia-Nuss M, Meyer JM, Hill CA (2014). Ticks (Ixodida). In *Protocols for Cytogenetic Mapping of Arthropod Genomes* (Ed: Igor V. Sharakhov), CRC Press.
- Gulia-Nuss M ve ark. (2016). Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature Communications*, 7:10507.
- Gunn SJ, Hilburn LR (1990). Cytosystematics of five North American *Dermacentor* (Acari: Ixodidae) species. *J Med Entomol*, 27(4):620-627.
- Güler S (1982). Ankara ve civarındaki koyun ve keçilerde kış ixodidaeleri üzerine araştırmalar. *UÜ Vet Fak Derg*, 1: 45-54.
- Güler S, Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E, Bektaş İ (1993). Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kene (Ixodidea) türleri. *Doğa Tr J Vet Anim Sci*, 17: 229-231.
- Hill CA, Wikel SK (2005). The *Ixodes scapularis* Genome Project: an opportunity for advancing tick research. *Trends Parasitol*, 21(4):151-153.
- İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö (2016). The Current Status of Ticks in Turkey: A 100-Year Period Review from 1916 to 2016. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 40(3): 152-157.
- Jongejan F, Uilenberg G (2004). The global importance of ticks. *Parasitol*, 129: S3-14.
- Kahn J (1964). Cytotaxonomy of ticks. *Quart J micr Sci*, 105(1): 123-137.
- Kar S, Yılmaz N, Akyıldız G, Gargılı A (2017). The human infesting ticks in the city of Istanbul and its vicinity with reference to a new species for Turkey. *Systematic and Applied Acarology*, 22(12), 2245-2255.

- Keskin A, Bursali A (2016). Detection of *Rickettsia aeschlimannii* and *Rickettsia sibirica mongolitimonae* in *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae) ticks from Turkey. *Acarologia*, 56(4): 533-536.
- Lim F, Khoo J, Chen F, Bell-Sakyi L, Khor C, Chang L, Bakar SA (2017). Initiation of primary cell cultures from embryonic *Haemaphysalis bispinosa* ticks. *Syst Appl Acarol*, 22(3): 323-332.
- Mansfield KL, Cook C, Ellis R, Bell-Sakyi L, Johnson N, Alberdi P, de la Fuente J, Fooks AR (2017). Tick-borne pathogens induce differential expression of genes promoting cell survival and host resistance in *Ixodes ricinus* cells. *Parasit Vectors*, 10: 81.
- Meyer JM, Kurtti TJ, Van Zee JP, Hill CA (2010). Genome organization of major tandem repeats in the hard tick, *Ixodes scapularis*. *Chromosome Res*, 18(3):357-370.
- Nene V (2009). Tick genomics – coming of age. *Front Biosci*, 14: 2666-2673.
- Oliver JH Jr (1977). Cytogenetics of Mites and Ticks. *Annu Rev Entomol*, 22:407-429.
- Orkun Ö, Karaer Z (2018). First record of the tick *Ixodes (Pholeoixodes) kaiseri* in Turkey. *Exp Appl Acarol*, <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0219-1>
- Öztürk R (2008). Enfeksiyon hastalıklarının değişen epidemiyolojisi. Dr. Mustafa Aydın Çevik Anısına II.Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu Kene Kaynaklı Enfeksiyonlar, Bildiri Kitabı, 11-20, Ankara.
- Palmer MJ, Bantle JA, Guo X, Fargo WS (1994). Genome size and organization in the ixodid tick *Amblyomma americanum*. *Insect Mol Biol*, 3: 57-62.
- Ribeiro JM, Slovák M, Francischetti IM (2017). An insight into the sialome of *Hyalomma excavatum*. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(2): 201-207.
- Ullmann AJ, Lima CM, Guerrero FD, Piesman J, Black IV WC (2005). Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Mol Biol*, 14: 217-222.
- Valenzuela JG, Francischetti IMB, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JMC (2002). Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol*, 205:2843-2864.
- Van Zee JP, Geraci NS, Guerrero FD, Wikel SK, Stuart JJ, Nene VM, Hill CA (2007). Tick genomics: the *Ixodes* genome project and beyond. *Int J Parasitol*, 37(12): 1297-1305.
- Vatansever Z, Uzun R, Estrada-Peña A, Ergonul O (2007). Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo hemorrhagic fever: A global perspective*. Springer.