**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARAZİTOLOJİ (VETERİNER)**

**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

***THEİLERİA ANNULATA*’NIN HÜCRE KÜLTÜRÜ PASAJLARINDA ATENÜASYON DÜZEYLERİNİN MOLEKÜLER BELİRTEÇLER İLE İNCELENMESİ**

**YL-2022-0107**

**BERİL KOÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ**

Bu tez **TÜBİTAK** tarafından **217O399** numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

**AYDIN–2022**

**KABUL VE ONAY**

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı (Veteriner) Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Beril KOÇ tarafından hazırlanan “*Theileria annulata*’nın hücre kültürü pasajlarında atenüasyon düzeylerinin moleküler belirteçler ile incelenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.07.2022

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Üye (T.D.) | : Doç.Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | … (imza) … |
| Üye | : Prof. Dr. Serkan BAKIRCI | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | … (imza) … |
| Üye | : Doktor Öğretim Üyesi Onur Köse | Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi | … (imza) … |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ……………..……..… tarih ve ………………………… sayılı oturumunda alınan …………………… nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

**TEŞEKKÜR**

Öncelikle bana her türlü desteği sağlayan başta ailem olmak üzere Yüksek Lisans tez çalışmamda bana her türlü imkânı veren ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ’e ve tez ikinci danışmanım Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ’e çok teşekkür ederim. Bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden, Prof. Dr. Serkan BAKIRCI, Dr. Öğr. Üyesi Selin HACILARLIOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Metin PEKAĞIRBAŞ’a desteklerinden dolayı ve çalışma arkadaşlarım Heycan Berk AYDIN ve Hakan KANLIOĞLU’NA desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

KABUL VE ONAY ………….i

TEŞEKKÜR ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ …………………iv

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

RESİMLER DİZİNİ viii

TABLOLAR DİZİNİ ix

ÖZET x

ABSTRACT xi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 2

2.1. Theileriosis 2

2.2. *Theileria annulata*’nın Epidemiyolojisi 4

2.3. Türkiye’de Tropikal Theileriosis 5

2.4. *Theileria annulata*’ nın Yaşam Döngüsü 7

2.5. Omurgalı Konakta Yaşam Döngüsü 9

2.6. Kenedeki Yaşam Döngüsü 11

2.7. Tropikal Theileriosis’de Patogenez ve Klinik Bulgular 12

2.8. Tropikal Theileriosiste Bağışıklık 13

2.9. Tropikal Theileriosisin Tanı 14

2.9.1. Klinik ve Mikroskobik Tanı 14

2.9.2. Serolojik Tanı 14

2.9.3. Moleküler Tanı 15

2.10. Tropikal Theileriosis Tedavisi 16

2.11. Tropikal Theileriosiste Koruma ve Kontrol 16

2.11.1. Vektör Kene Mücadelesi 16

2.11.2. Dirençli Sığır Irkları Seçilmesi 17

2.11.3. Aşılama 18

3. GEREÇ VE YÖNTEM ………26

3.1. Gereç 26

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali 26

3.2. Yöntem 27

3.2.1. Atenüasyon Seviyesinin Belirlenmesi 27

3.2.1.1. *Theileria annulata* İzolatlarından cDNA Elde Edilmesi 29

3.2.1.2. Belirlenen Gen Bölgelerinin Her Bir T*. annulata* İzolatının Farklı Pasajlarındaki Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi 32

3.2.2. Dizilim Analizleri 33

3.2.3. Veri Analizleri 34

4. BULGULAR ….35

4.1. Belirlenen Gen Bölgelerinin Farklı Pasajlarındaki Ekspresyon Seviyeleri 35

4.2. Dizilim Sonuçları 42

5. TARTIŞMA 46

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 51

7. KAYNAKLAR 52

8. BİLİMSEL ETİK BEYANI 73

9. ÖZ GEÇMİŞ 74

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

**%:** Yüzde

**ADAM-19:** Yıkımlayıcı ve Metalloproteinaz 19

**AP-1:** Aktivatör Protein 1

**ATF 2:**  Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 2

**bp:** Baz çifti

**CD:** Cluster of Differentiation (Farklılaşım Kümesi)

**cDNA:** Komplementer DNA

**CK-2:** Kazein Kinaz-2

**DNA:**  Deoksiribo Nükleik Asit

**ECM:** Ekstra selüler matriks

**g:** Gram

**HDAC:** Histon Deasetilazlar

**HRPT-1:** Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1

**HSP-90:**  Isı Şok Proteini

**IFAT:**  Indirekt Fluoresan Antikor Testi

**IL:** İnter Lökin

**ITGB-5:** İntegrin Beta 5

**JNK:** c-Jun N-terminal kinaz

**LAMP:** Loop-mediated izotermal amplifikasyon

**MHC:** Major histocompatibility complex

**MMP:**  Matriks Metalloproteaz

**NK:** Natural Killer

**NO:**  Nitrit Oksit

**ºC:** Derece Celsius

**PKC:**  Protein Kinaz C

**PZR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**RES:**  Retikülo Endotelyal Sistem

**RLB:** Reverse Line Blotting

**RNA:**  Ribonükleik asid

**Rpm:** Dakikadaki Devir Sayısı

**Ta9:** *T. annulata* paralog aile antijeni

**TaD:**  Şizont Proteini

**TaSe:**  Şizont yüzey antijeni

**TaSP:**  *T. annulata* yüzey antijeni

**TIMP-3:** Metalloproteinaz doku inhibitörü

**TLR:** Toll Like Reseptor

**TNF a:** Tümör Nekroz Faktörü- alfa

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

**Şekil 1.** Sığırlarda hastalık oluşturan *Theileria* türlerinin dağılımı………………………......3

**Şekil 2.** *T. annulata*’nın yaşam döngüsü…………………………………………………......8

**Şekil 3.** Merozoit, sporozoit, kene bağırsağındaki mikrogamet, kinet görüntüsü………......11

**Şekil 4.** Bir parçalayıcı ve metalloproteinazın (ADAM) etki alanı yapıları………………...21

**Şekil 5.** HADC (**A**), TIMP-3 (**B**), ADAM-19 (**C**) ve HRPT-1 (**D**) genlerinin farklı pasajlardaki *T. annulata* izolatlarındaki ekpresyon düzeyleri……………………………………………41

**Şekil 6.** Klonlanarak, pürifiye edilen ADAM-19, HRPT-1, TIMP3 ve HDAC gen bölgelerinin dizilim analiz sonuçları ile ve NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=) veri tabanında kayıtlı ilgili gen bölgelerine ait referans nükleotid dizilimleri ile karşılaştırma sonuçları…………………………………………………………………………………44-45

**RESİMLER DİZİNİ**

**Resim 1.** Giemsa boyalı lenf yumrusu biyopsi sürme preparat görüntüsü 10

**Resim 2.** Giemsa boyalı kan froti görüntüsü 10

**Resim 3.** HDAC, ICAM-1, MMP9 ve HRPT-1 gen bölgelerine özgü markerler kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü 36

**Resim 4.** TIMP-3, ADAM-19, ITGB-5, CD69, HSP90 gen bölgelerine özgü markerler kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü 37

**Resim 5.** HRPT-1, TIMP-3, ADAM-19, HDAC markerleri kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü 38

**Resim 6.** pCR™4-TOPO™ vektörü içerisinde klonlanmış ADAM 19, TIMP 3, HDAC ve HRPT 1 gen bölgelerini içeren ait 1µg pürifiye plazmid DNA’nın *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi ile elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüleri 43

**TABLOLAR DİZİNİ**

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan *T. annulata* hücre kültürü hatları ve pasaj sayıları 26

**Tablo 2.** Atenüasyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan markerler 28

**Tablo 3.** Elde edilen RNA örneklerinin birinci ve ikinci DNase ile muamele sonrasındaki RNA miktarları ve final konsantrasyonları 31

**ÖZET**

***THEİLERİA ANNULATA*’NIN HÜCRE KÜLTÜRÜ PASAJLARINDA ATENÜASYON DÜZEYLERİNİN MOLEKÜLER BELİRTEÇLER İLE İNCELENMESİ**

**Koç B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji (Veteriner Programı), Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.**

**Amaç:** Bu araştırma *T. annulata* ile enfekte hücre kültürünün düşük, orta ve yüksek pasajlı suşlarında *T. annulata*’ya özgü atenüasyon markerları kullanılarak hedef gen bölgelerindeki ekspresyon seviyelerindeki farklılaşmaları tespit etmek amacı ile yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada parazit materyali olarak, *T. annulata* ’nın Acarlar ve Cincin izolatlarına ait düşük, orta ve yüksek pasajlar, Ankara/Pendik izolatının orta ve yüksek pasajları ile aşı suşu olan TeylovacTM kullanılmıştır. İlk olarak, ilgili her bir izolattan RNA ektrakte edilmiş ve akabinde ekstrakte edilen her bir RNA örneğinden cDNA'lar sentezlenmiştir. Daha sonra atenüasyon markerları kullanılarak RT-PZR yapılarak farklı aşamadaki pasajlarda ilgili makerlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

**Bulgular:** Yapılan incelemeler sonucunda HDAC, ADAM-19, MMP9 ve TIMP-3 gen bölgelerinin ekspresyon seviyeleri ölçülmüş ve farklı pasajlara sahip izolatlar arasında gen ekspresyon seviyelerinde önemli bir artış veya azalma tespit edilmemiştir.

**Sonuç:** Bu araştırmada atenüasyon markerı olarak belirlenen gen bölgelerinin kullanılan tüm izolatlarda eksprese edilmediği tespit edilmiştir. Ayrıca *T. annulata* hücre hatlarının farklı pasajları arasında ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri arasında pozitif ve/veya negatif korelasyon belirlenemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Atenüasyon, aşı, hücre kültürü, marker *Theileria annulata*

**ABSTRACT**

**INVESTIGATION OF ATTENUATION LEVELS OF *THEILERIA ANNULATA* IN CELL CULTURE PASSAGES WITH MOLECULAR MARKERS**

**Koç B. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Parasitology (Veterinary Medicine), Msc Thesis, Aydın, 2022.**

**Objective:** This study was carried out to detect the differences in expression levels in target genes using *T. annulata*-specific attenuation markers in low, medium and high passage strains of *T. annulata* infected cell culture.

**Materials and Methods:** In this study, low, medium and high passages of Acarlar and Cincin isolates of *T. annulata*, medium and high passages of Ankara/Pendik isolate of *T. annulata* and vaccine strain, TeylovacTM, were used as parasite material. Initially, RNA was extracted from each related isolate, and cDNAs were synthesized of each extracted RNA sample. Then, the expression levels of each gene at different stages of passage were investigated by RT-PCR using attenuation markers.

**Results:** As a result, the expression levels of HDAC, ADAM-19, MMP9 and TIMP-3 gene regions were measured and no significant increase or decrease in gene expression levels were determined among isolates with different passages.

**Conclusion:** In this study, it was determined that genes used as attenuation markers were not differencially expressed in all isolates. Additionally, no positive and/or negative correlation was found between the expression levels of related genes among different passages of *T. annulata* cell lines.

**Keywords: A**tenuation,cell culture, marker*, Theileria annulata*, vaccine

1. GİRİŞ

*Theileria annulata*’nın keneler aracılığı ile taşınması, hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda tedavi maliyetinin yüksek oluşu, kullanılan ilaçların etkeni tamamen yok edememesi, hastalıkla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Tropikal theileriosisten korunmada uygulanan en önemli yöntem aşılamadır. *Theileria annulata* şizontları ile enfekte sığır lenfositlerinin *in vitro* olarak canlılıklarını koruyabildiklerinin belirlenmesi parazite karşı aşı geliştirilmesindeki en önemli basamağı oluşturmuştur (Onar 1989; Pipano 1989a; 1989b; Brown 1990). *İn vitro* ortamda atenüye edilmiş şizontlar ile enfekte mononükleer hücreler kullanılarak üretilmiş aşılar günümüzde yaygın olarak Türkiye’nin de içerisinde bulunduğu pek çok ülkede (Pipano ve Tsur, 1966; Hashemi-Fesharki, 1988; Gupta ve diğerleri, 1998; Stepanova ve Zablotsky, 1989; Ouhelli ve diğerleri, 1997; Sayın ve diğerleri, 1997; Viseras ve diğerleri, 1997; Darghouth, 2008; Zhang, 1997) hastalığın kontrolünde kullanılmaktadır.

Atenüasyon oranı yapılan pasaj sayısı ile doğru orantılıdır. Atenüasyon temel olarak kullanılan hücre hatlarının pasajlanıp patojenite ve merozoit oluşturma kabiliyetlerinin zayıflatılması presibine dayanmaktadır. Pasajlama ile beraber hücre hatlarındaki genotipik yapı farklılaşmakta (seleksiyona uğramakta) ve bazı gen bölgelerinin ekspresyon seviyeleri değişikliğe uğramaktadır (Sutherland ve diğerleri, 1996). Yüksek pasajlı hücre hatları, düşük pasajlara kıyasla daha uzun süreli bir koruyucu bağışıklık sağladıkları ve yüksek pasajlı hücre hatları ile aşılanan hayvanlarda piroplazmik formların şekillenmediği dolayısıyla da etkenin kenelere aktarılamadığı bildirilmiştir (Ouhelli ve diğerleri, 1989; Ilhan 1995). Atenüasyon ile enfekte T lenfositler ve hücrelerin ürettiği sitokinler arasındaki ilişki, yüksek hücre kültürü pasajlarından elde edilen klonal hücrelere göre düşük hücre kültürü pasajlarından elde edilen klonal hücrelerin hastalığın patogenezini daha az tetiklediği tespit edilmiştir (Brown 1997, Brown ve diğerleri, 1998). Bununla birlikte atenüasyondaki moleküler etkileşmeler tam olarak belirlenememiştir. Bu projenin amacı *T. annulata* ile enfekte hücre kültüründe düşük, orta ve yüksek pasajlı suşlarda bazı genlerde meydana gelen farklılaşmaları belirleyerek *T. annulata*’ya özgü atenüasyon markerları olarak kullanılıp kullanılamayacaklarını tespit etmektir.

1. **GENEL BİLGİLER**

**2.1. Theileriosis**

Theileriosis sığır, koyun, keçi, manda gibi ruminantlarda hastalık oluşturan, *Ixodidae* ailesine bağlı keneler ile taşınan ve lenfoid dokuların kontrolsüz hiperplazisi ile karakterize bir hastalıktır. Sığırlarda, *Theileria parva, T. annulata, T. mutans, T. taurotragi, T. sergenti/buffeli/orientalis* grubu*, T. velifera* ve *T. sinensis* olmak üzere yedi *Theileria* türü bulunmaktadır. *T. annulata* ve *T. parva* sığırlarda hastalık oluşturan *Theileria* türlerinden en patojen olanlarıdır (Uilenbeng, 1981). Sığırlarda hastalık oluşturan *T. annulata*, *T. parva* ile *T. sergenti/buffeli/orientalis* grubunda bulunantürlerinin dünya üzerindeki dağılımı Şekil 1’de gösterilmiştir. Sığırlarda theileriosise neden olan *Theileria* türlerinin sınıflandırılmasında, şizont ve piroplazmların morfolojik yapıları, vektör keneler, *Theileria* türünün patojenitesi, biyolojik karakterleri ve serolojik tanımlamalara göre yapılmaktadır. Ancak *Theileria* türlerinin ayrımında filogenetik analizlerin dikkate alınması gerekmektedir (Chae ve diğerleri, 1999; Gubbels ve diğerleri, 2000). *Theileria annulata* 1904 yılında Kafkasya sığırlarında keşfedilmiş ve etkene *Piroplasma annulata* hastalık ise tropikal piroplazmoz olarak tanımlanmıştır (Dschunkowsky ve Luhs, 1904). Daha sonra ise bu hastalığa tropikal theileriosis, Akdeniz Sahil Humması, Mısır Humması gibi isimler verilmiş ve etken *Theileria annulata* olarak isimlendirilmiştir (Mimoğlu ve diğerleri, 1969). Dünyanın farklı bölgelerinde olduğu gibi, Türkiye’nin tüm coğrafi bölgelerinde de görülmekte ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Sayın ve diğerleri, 2003). Hastalığın yaygın olarak görülmesinin esas nedeni hastalığa vektörlük yapan *Hyalomma* soyuna bağlı ixodid keneler için hastalık gözlenen bölgelerdeki çevre koşullarının uygun olmasıdır (Purnell, 1978). *T. annulata* omurgasız konak olan kenelerde trans-stadial olarak *Hyalomma* soyuna bağlı iki ya da üç konaklı kenelerle nakledilmektedir. *T. annulata’* nın nakledilmesinde başta *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. scupense* (=*H. detritum*) ve *H. marginatum* olmak üzere aynı soydan 15 kene türü tarafından taşınmaktadır. (Samish ve Pipano, 1976; Uilenberg, 1981a; Karaer, 1985; Soulsby, 1986; Dumanlı, 1987). Coğrafik ve iklimsel koşullara göre bölgeler arasında farklılıklar göstermekle beraber hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgelerde vakalara Haziran- Eylül ayları arasında rastlanmakta, ancak yıl boyunca sporodik olarakta gözlenebilmektedir (Sergent, 1945; Pipano, 1976; Flach ve Ouhelli, 1992).

Levine (1988)’na göre *T. annulata*’nın sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir.

Alem: Animale

Alem altı: Protozoa

Anaç: Apikomplexa

Sınıf: Sporozoea

Sınıf altı: Piroplasmia

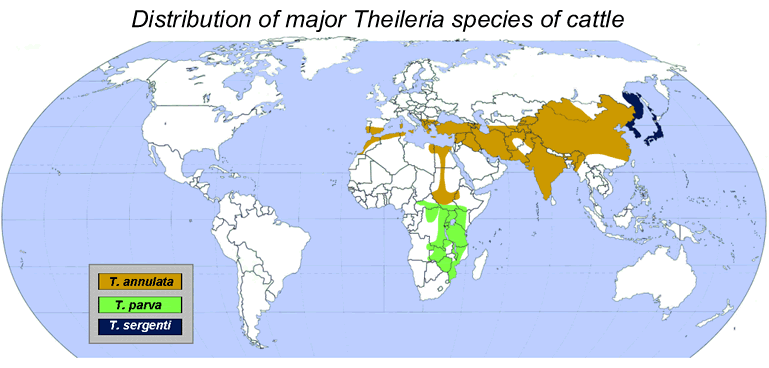
Dizi: Piroplasmida

Aile: Theileriidae

Soy: *Theileria*

Tür: *T. annulata* (Dschunkowsky ve Luhs, 1904)

*T. parva* (Theiler, 1904) ve diğer türler



**Şekil 1.** Sığırlarda hastalık oluşturan *Theileria* türlerinin dağılımı ([www.theileria.org/ahdw/pictures/largemap.gif](http://www.theileria.org/ahdw/pictures/largemap.gif))

**2.2. *Theileria annulata*’nın Epidemiyolojisi**

*Theileria annulata’nın* epidemiyolojisi parazit ve vektör dağılımını, hastalığın mortalite ve morbiditesini, hastalık kontrol önlemleri, sosyo-ekonomik faktörler, iklim değişikliği, konakçı direnci ve duyarlılığı ile ilişkilidir (Gachohi ve diğerleri, 2012). *Theileria annulata* ya da neden olduğu tropikal theileriosis, Güney Avrupa ve Akdeniz kıyıları, Doğu ve Kuzey Afrika, Orta ve Güney Asya'da yaygın olarak görülmektedir (Spickler, 2010). Tropikal theileriosis'in coğrafi dağılımı ve hastalığın görülme sıklığı *Hyalomma* cinsi kenelerin konumu ve biyolojisi tarafından belirlenmekte ve kenenin ekolojik özelliklerinden dolayı mevsimsel seyrekmektedir. (Pieszko, 2015; Bakor, 2008). *T. annulata*'nın en önemli vektörleri *H. anatolicum* (Dhar ve diğerleri, 1982; Sangwan ve diğerleri, 1989) ve *H. scupense’*dir (Samish ve Pipono, 1978)’dur. Ayrıca hastalığın naklinde *H. excavatum*, *H. marginatum* ve *H. dromedarii* keneleri de rol oynamaktadır (Samish ve Pipano, 1983; Bhattacharyulu ve diğerleri, 1975). Theileriosis trans-stadial olarak keneler tarafından nakledilebilmekte ve trans-stadial bulaşmada kenenin etkeni nakletmesi için kenenin gömlek değiştirip, bir sonraki evreye geçmesi gerekmektedir. Örneğin; larva döneminde alınan etkeni, kene ancak gömlek değiştirip nimf döneminde nakledebilmekte, nimf döneminde alınan etken erişkin dönemde nakledilebilmektedir (Pipano, 1965; Bhattacharyulu ve diğerleri, 1975; Levine, 1985). Larva ve nimf döneminde keneler olgun döneme kıyasla küçük oldukları için sindirilen kan hacmi ve buna bağlı olarak enfekte kan hücreleri daha az olmaktadır. Sindirilen kan hacmi larva ve nimfte, yetişkin kenelerden daha düşüktür. Ayrıca farklı kene türlerinde bağırsak epitel yapısının da değişmesi parazitin gelişmesini etkilemektedir. (Shaw, 1997; Shaw 2003). *Theileria* türleleri için yaşam döngüsü, kenenin son konaktan kan emme esnasında tükürük bezi asini hücrelerinde bulunan enfektif sporozoitleri omurgalı konağa nakletmesiyle başlar (İmren ve diğerleri, 1991; Alaçam ve diğerleri, 1997; Taha ve diğerleri, 2108). Sporozoitlerin konak hücrelerine giriş yeri kenenin kan emdiği taraftaki lenf yumrusudur. Sporozoitler birkaç gün içerisinde lökositleri istila ederek, hastalığa neden olmaktadır (Aytuğ ve diğerleri, 1990; Morrisson ve diğerleri, 2015; Kahn ve diğerleri 2010; Gül ve diğerleri, 2012). *T. annulata*’nın monosit ve makrofaj kökenli MHC tip-II hücrelerini enfekte ettiği ve daha az oranda T-lenfositleri etkilediği, *T. parva’*nın ise T-lenfositleri enfekte edip, monosit ve makrofajları enfekte edemediği *in vitro* deneylerde ortaya konmuştur (Glass ve diğerleri, 1989). Sığırlardaki piroplasm parazitemisini etkileyen önemli faktörlerden biri, nimf dönemindeki kenenin beslenme doygunluğuna ulaşarak konaktan ayrılmasıdır (Young ve diğerleri, 1996).

**2.3. Türkiye’de Tropikal Theileriosis**

Tropikal theileriosis ülkemizdeki protozon kaynaklı ve kenelkerle naklaedilen sığır hastalıklarının en önemlilerinden biridir. Hastalık bazı bölgelerde endemik karakterde olmakla birlikte Türkiye’nin tüm bölgelerinde bildirilmiştir. (Sayın ve diğerleri, 2003; Bilgiç ve Karagenç, 2018).

*Theileria annulata*, Türkiye’nin İç Anadolu (Göksu 1959, 1970; Özcan, 1961; Ünseren ve diğerleri, 1988), Doğu Anadolu (Dumanlı ve diğerleri, 1987; Göksu, 1970), Güneydoğu Anadolu (Mimoğlu ve diğerleri, 1971; Göksu, 1970), Karadeniz (Göksu, 1970; Mimoğlu, 1955; Açıcı, 1983), Marmara (Göksu, 1970; Tüzer, 1981), Ege (Erkut, 1967; Göksu, 1970) ve Akdeniz (Göksu, 1970) bölgelerinde rapor edilmiştir. Tropikal theileriosis vakaları mayıs ve eylül ayları arasında sık görülmekte ve en yüksek vaka sayısı temmuz ayında ortaya çıkmaktadır. Bu aylarda vaka sayısındaki artışa paralel olarak yetişkin *Hyalomma* kenelerinin sayısı da artmaktadır (Göksu, 1959; Özcan, 1961). Türkiye'de farklı araştırıcılar tarafından farklı zamanlarda mikroskobik bakıyla yapılan çalışmalarda, tropikal theileriosis etkeni olan *T. annulata'* nın yayılışı; İç Anadolu bölgesinde %94,3 (Özcan, 1961), Karadeniz bölgesinde Göksu (1970)'ya göre %20, Mimioğlu (1955)'na göre %22,8, Dinçer ve diğerleri (1991)'ne göre %32,8, Marmara bölgesinde %13 (Tüzer, 1981) ve Ege bölgesinde ise %43,2 (Erkut, 1967) oranında olduğu bildirilmiştir.

Türkiye'nin beş farklı coğrafi bölgesindeki 1-8 yaşlı sığırlar üzerinde yapılan çalışmada IFA testi ile *T. annulata'* nın prevalansı; Ege bölgesinde %40,0, Karadeniz bölgesinde %46,8, İç Anadolu bölgesinde %29,0, Marmara bölgesinde %33,3, Güneydoğu Anadolu bölgesinde %91,4 olarak saptanmıştır (Eren ve diğerleri, 1995).

Türkiye’nin Elâzığ, Malatya, Bingöl, Muş, Van, Erzincan, Erzurum, Kars, Adıyaman, Diyarbakır ve Şanlıurfa gibi doğu illerinden toplanan kan örneklerinden yapılan PZR testi sonucunda, en yüksek pozitiflik %74,6 ile Diyarbakır'dan, en düşük %1,4 ile Erzurum'dan elde edilmiştir. Aynı illerde IFA testinde en yüksek seropozitiflik Şanlıurfa’ da (%81,2), en düşük seropozitiflik Erzurum'da (%2,7) tespit edilmiş ve Kars’ ta seropozitiflik belirlenmemiştir (Dumanlı ve diğerleri, 2002).

Ankara ilinin farklı yerlerinden 1990-1993 yılları arasında toplanan örnekler IFA testi ile incelenmiştir. %50,7 oranında *T. annulata* enfeksiyonuna rastlanmış ve %0,5'i hastalık sezonu başında görülmüştür. Ek olarak %14,3’ünün yeni vaka olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kan alınan hayvanlardan *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. scupense* ve *H. marginatum* türü keneler belirlenmiş ve hayvanların üzerindeki kenelerin çoğunun yetişkin olduğu ve en yoğun kene enfeksiyonunun yaşlı hayvanlarda görüldüğü belirtilmiştir (Sayın ve diğerleri, 2003). Kapadokya'daki sığırlarda tropikal theileriosisin prevalansını araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada toplam 554 aşılanmış ve aşılanmamış hayvanın mikroskobik bakıda %60,5 ve IFA testi ile %67,5 oranında pozitflik göstediği tespit edilmiştir. İncelenen sığırların %21,8'inde *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Boophilus* ve *Ornithodorus* cinsine ait toplam 1585 kene örneği tespit edilmiştir (İnci ve diğerleri, 2007). Kayseri ve çevresindeki sığırlarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin prevalansını belirlemek amacıyla mikroskobik bakı ve RLB testi kullanılarak yapılan bir çalışmada; mikroskobik incelemede 51 (%15,1) kanda parazitin piroplazm formuna rastlanmış, RLB testinde 61 (%18,1) *T. annulata* için pozitif ve 3 (%0,9) *T. buffeli/orientalis* için pozitif olduğu belirlenmiştir (İça ve diğerleri, 2007).

Zhou ve diğerleri (2016) tarafından 2011-2014 yılları arasında yapılan bir çalışmada, Türkiye’ nin Konya (110), Karaman (12), Adana (13), Şanlıurfa (9), Diyarbakır (13) ve Kırklareli (39) illerindeki sığırlardan toplanan kan örneklerinde *T. annulata* (%18,9) oranında tespit edilmiştir (Zhou ve diğerleri,2016). Türkiye'nin Burdur ilinde 2021 yılında theileriosis ve babesiosis’e karşı epidemiyolojik verilerin ortaya konması ve gerekli kontrol önlemleri alınması amacıyla yapılan çalışmada toplam 964 adet koyun (330), keçi (300) ve sığır (334) türlerinde kan örnekleri alınmıştır. Çalışmada, reverse line blotlama (RLB) yöntemi kullanılmış ve sığırlarda *T. annulata*, *B. bovis*, *Babesia* spp. sırasıyla %0,59, %3,29, %3,59 oranlarında tespit edilmiştir (Köse ve diğerleri, 2021).

Aysul ve diğerlerinin (2008) Aydın ilindeki sığırlarda tropikal theileriosisin prevalansının IFA testi ile tespiti üzerine yapmış olduğu çalışmada, iki farklı grup değerlendirilmiş olup aşılanmış olan gruptaki 77 (%38,1), aşılanmamış grupta ise 24 (%11,7) hayvanda seropozitiflik tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada 1248 adet kene toplanmış olup identifikasyon sonucunda en sık görülen türler *H. scupense, H. anatolicum*, *H. marginatum* olarak bulunmuş ve *H. scupense’*nin enfeksiyon oranının %10 ile %50 arasında olduğu tespit edilmiştir.

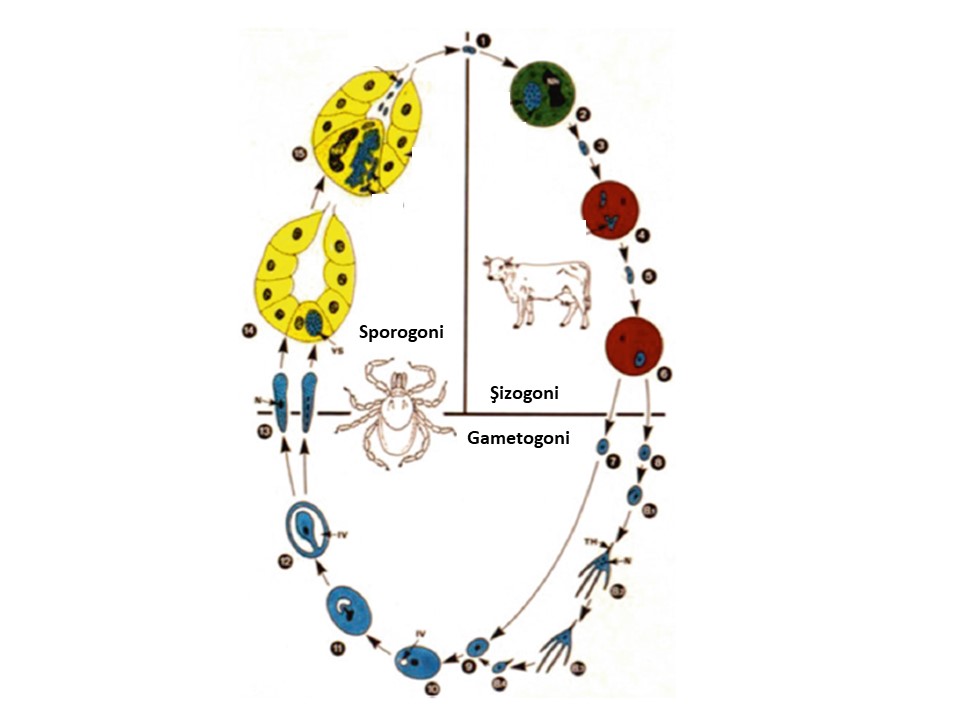
Aydın ilinde yapılan bir çalışmada 3918 sığır kan örneği RLB tekniği ile incelenmiş ve %54,92 (2152) oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (Pekel, 2014). Yine aynı çalışmada hastalığın görülme sıklığının en fazla görülen aylar sırasıyla Eylül %64,12, Ekim (%63,15), Kasım (%62,9), Ocak (%62,5) ve Haziran (%61,02) oranında tespit edilmiştir. En düşük oran ise temmuz ayında %40,76 olarak tespit edilmiştir (Pekel, 2014).

Ege Bölgesinde sığırlarda görülen kene varlığının belirlenmek amacıyla Aydın, İzmir ve Manisa illerine bağlı ilçelerde yapılan bir çalışmada; *Hyalomma* soyuna bağlı *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. scupense*, *H. marginatum* ve *H. rufipes* türü kenelere rastlanmıştır. Aydın ve yöresinde sığırlarda çoktan aza doğru *H. marginatum* (%48,28), *H. excavatum* (%25,27), *H. scupense* (%17,72) ve *H. anatolicum* (%1,24) türü kenelere rastlanmış ve barınak duvarlarından toplanan keneler incelendiğinde en yoğun kene türü (%91,43) *H. scupens olarak tespit edilmiştir* (Bakırcı, 2009). Ege Bölgesindeki sığırlarda *H. marginatum* ve *H. excavatum* en yaygın kene türleri olarak tespit edilmiş, *H. anatolicum*’a ise oldukça düşük oranda rastlanmıştır (Bakırcı ,2009).

**2.4. *Theileria* *annulata*’ nın Yaşam Döngüsü**

*Theileria annulata* keneler tarafından trans-stadial olarak nakledilmektedir (Pipano 1965; Uilenberg, 1981a; Gautam ve Dhar, 1983; Levine, 1985; Bhattacharyulu ve diğerleri,1975). Larva evresinde etkeni alan kenenin gömlek değiştirip nimf döneminde veya nimf döneminde alan kenenin gömlek değiştirip bir sonraki gelişme dönemi olan erişkin dönemde yeni konakçılara etkeni nakledebilmektedir (Şekil 2) (Morrisson ve diğerleri, 2015; Gül ve diğerleri, 2012). Ancak, yumurtlama sonrasında oluşan yeni nesile etkenler nakledilmemekte, yani trans-ovarial nakil gerçekleşmemektedir. Omurgalı arakonakta *T. annulata’nın* gelişimi vektör kenenin enfeksiyonu sığırlar üzerinde beslenirken nakletmesiyle başlamaktadır. *T. annulata*’nın omurgalı ve omurgasız konaklardaki bütün intrasellüler safhaları (şizont, piroplasm, zigot-kinet, sporoblast) konak sitoplazmasında serbest halde bulunup bir parazitofor vakuol içerisinde gelişmemektedir (Mehlhorn, 1984; Shaw, 2003).

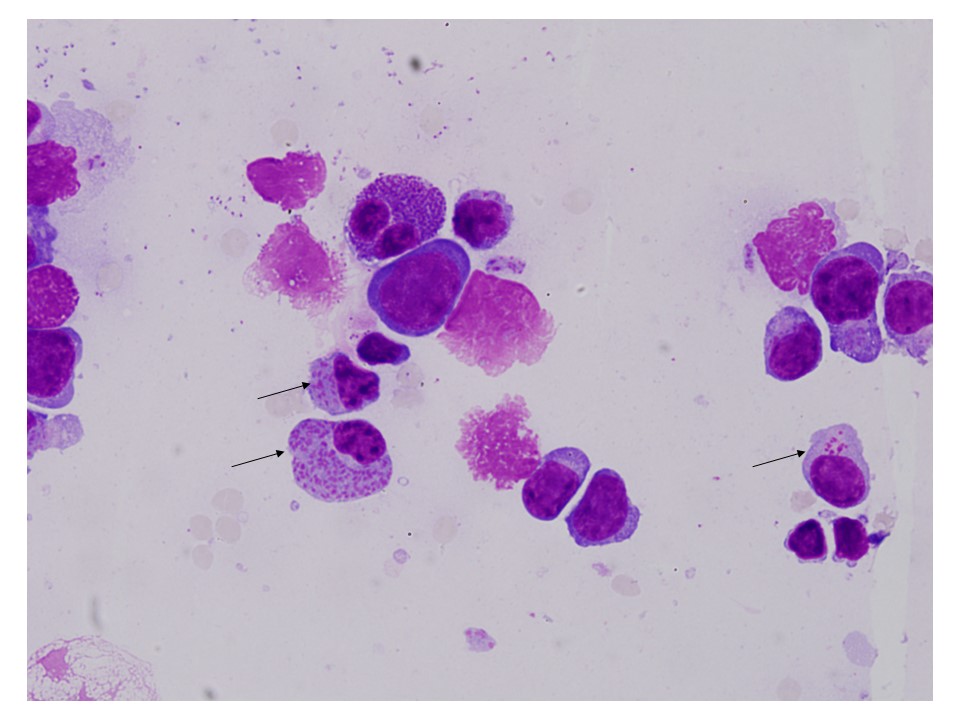
Etkenin omurgalı ve omurgasız konakta hücre içine girmesi, yaşamsal fonsiyonlarını devam ettirmesi ve çoğalması güçlü bir adaptasyon yeteneğinin göstergesidir (McKeveer ve Dobbelare, 2002).

**Şekil 2.** *Theileria annulata*’nın yaşam döngüsü. 1; sporozoit (kene beslenmesi esnasında inokule edilmektedir), 2; koch cisimciği (Lenfosit sitoplazması içinde bulunmakta ve merozoitleri oluşturmaktadır), 3; hareketli merozoitler eritrositlere girerken, 4; Eritrosit içinde hücre üremesi, 5; serbest merozoitler diğer eritrositlere girerken, 6; oluşan gamontlar, 7-8; kene bağırsağında eritrositlerde serbest haldeki gamontlar, , 8.1–8.4; füzyon yoluyla mikrogametin oluşması ve 9; makrogamet ile birleşme, 10; zigot, 11–13; kenenin bağırsak hücrelerinin içindeki oval hareketsiz zigottan hareketli kinet oluşması, 14; kenenin gömlek değiştirip yeni bir konakçıdan beslenmesi esnasında kinetlerin tükürük bezlerinin sitoplamasına girmesi ve akabinde meydana gelen tekrarlanan bölünmeler sonucu oluşan sporontlar, 15; büyük ölçüde genişlemeiş parazit ihtiva eden konak hücre ve çekirdekleri (Mehlhorn ve Schein, 1984).

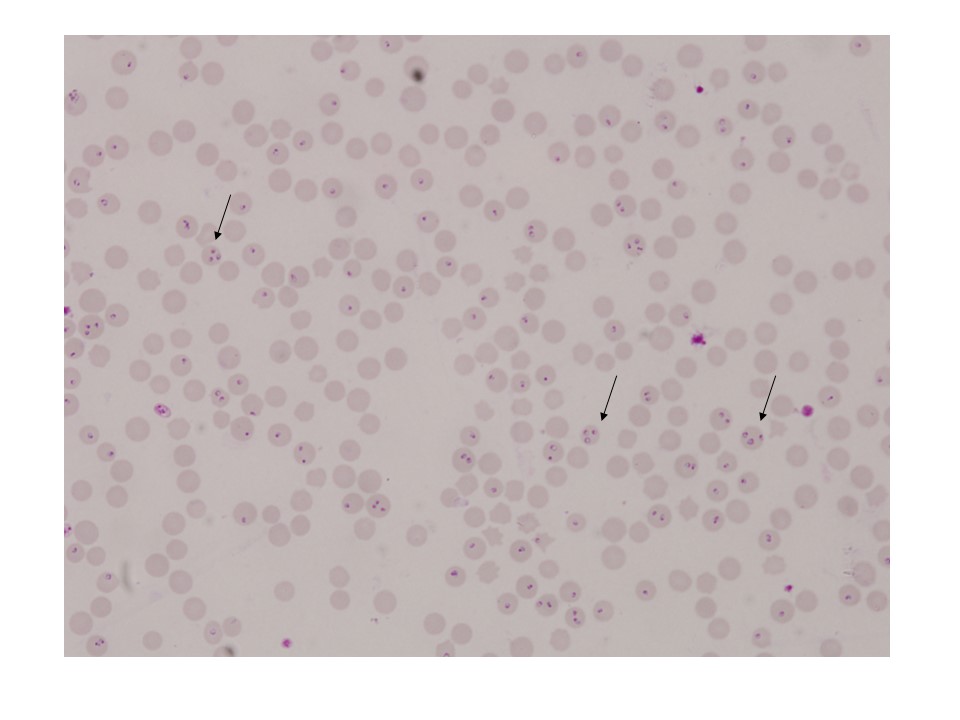
**2.5. Omurgalı Konakta Yaşam Döngüsü**

*Theileria annulata*’nın yaşam döngüsü larva veya nimf aşamasındaki enfekte kenelerin omurgalı konak olan sığır üzerinde kan emmesiyle başlamaktadır (Samish ve Pipano, 1978; Shaw ve diğerleri, 2002). Enfekte kenenin tükürük bezi asini hücrelerinde bulunan enfektif *T. annulata* sporozoitleri omurgalı konaktan kan emme esnasında tükürük salgısı yoluyla son konağa aktarılır. Sporozoitler hareketsizdir ve konak hücre yüzeyi ile geri dönüşümsüz olarak bir bağ oluşturmaktadır. Etken çok kısa süre içinde en yakın lokal lenf yumrularına geçmekte, ardından lenfosit içindeki etken çekirdek bölünmesi sonucu makroşizontları oluşturmaktadır. (Fawcett ve diğerleri, 1984; Shaw ve diğerleri, 2000; Shaw ve diğerleri, 1991; Bishop ve diğerleri, 2009). *Theileria annulata* sığırlarda retikülo-endotelial sistemde monosit ve B lenfositler içinde, kanda ise eritrositler içinde yerleşim göstermektedir (Spooner ve diğerleri, 1989; Shaw, 2002).

Enfeksiyonu takip eden 5. günden itibaren yapılan mikroskobik incelemelerinde lenfositler içerisindeki makroşizontlar (Resim 1) görülebilmektedir (Neitz, 1957; Gautam ve Dhar, 1983; Anon, 1984; Mehlhorn ve Schein, 1984; Levine, 1985). Başlangıç safhasında şizontlar, oldukça büyük ve 1.9 μm büyüklüğünde kromatin granüllerine sahiptir. Enfeksiyonun 8-10’uncu günlerinde ise çekirdek büyüklüğü yaklaşık 0.8 μm olan daha küçük merozoitler oluşmaktadır. Oluşan merozoitler hücreyi parçalayarak serbest hale geçer ve serbest kalan bu merozoitler eritrositlerin içine girerek rhoptri proteinleri sayesinde konak hücre membranından kurtulmaktadır. Merozoitlerin hücre içine girişinde parazit yüzeyi ile konak mikrotübülleri ilişkili değildir (Shaw 2003). Eritrosit içinde serbest kalan etken piroplasm adını alır ve inokülasyonunun 8-10. gününde itibaren kan frotilerinin giemsa ile boyanıp piroplasmların görülmesiyle tanı konulabilmektedir (Resim 2). Piroplasmlar oval, virgül ya da küre şeklinde olabilmektedir. Bu şekillerin, %20-30’unu virgül, %70- 80’ini oval veya yuvarlak formlar oluşturmaktadır. Bu safhada eritrosit içindeki etkende bölünme meydana gelmekte ve eritrositlerin yaklaşık %90’ını enfekte edebilmektedir (Gautam ve Dhar, 1983; Anon, 1984; Mehlhorn ve Schein, 1984; Levine, 1985). Sığırlar parazitin bu formunu uzun yıllar taşıyabilmektedir (Mehlhorn, 1984; Pipano ve Shkap, 2006).

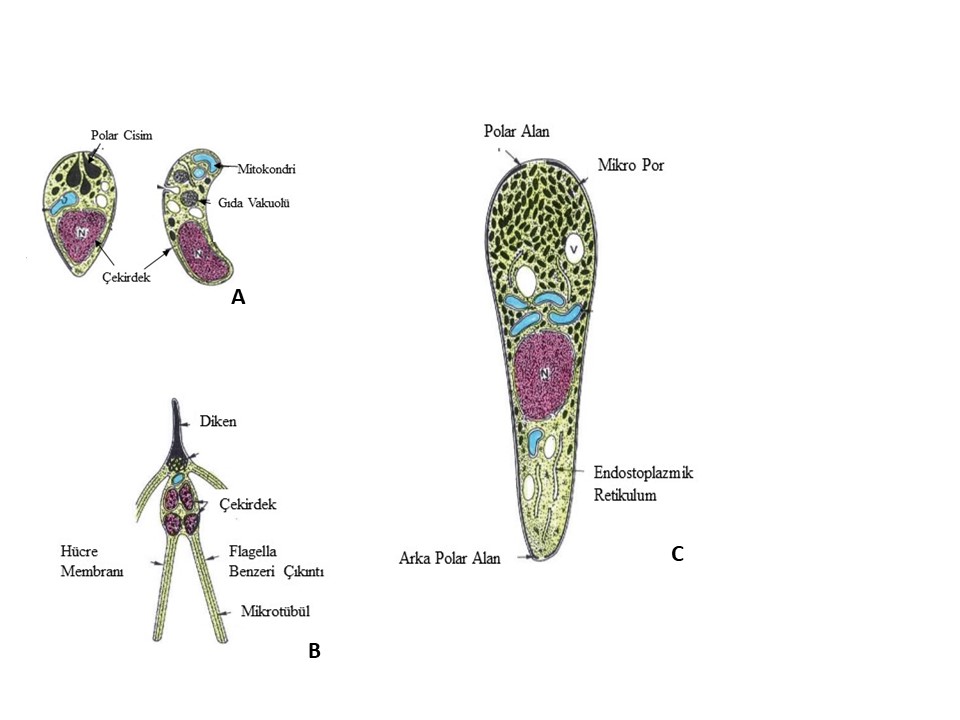
****

**Resim 1**. Sığır lenf yumrusu biyopsisinin giemsa ile boyanmış sürme preparatı (orijinal).



**Resim 2**. Giemsa boyalı kan froti görüntüsü. *T. annulata* piroplasmları ok işaretleriyle gösterilmiştir (orijinal).

**2.6. Kenedeki Yaşam Döngüsü**

Keneler, omurgalı konaktan kan emme sırasında aldıkları piroplasm ile enfekte eritrositleri midelerinde sindirirler ve bu sayede eritrositler içerisindeki piroplasmlar serbest hale geçer. Serbest hale geçen piroplazm formları kene bağırsağında gelişip, iplik şeklinde 10-12 μm uzunluğunda mikrogametlere (tek kuyruklu) ve 5-6 μm çapında yuvarlak makrogametlere farklılaşırlar. Altıncı günde mikrogametlerin ve makrogameti döllenmesiyle kene bağırsak epitelinde zigotlar oluşmakta ve oluşan bu zigotların hareket kabiliyeti kazanmasıyla etkenler kinet adını almaktadır (Schein, 1975; Gautam ve Dhar, 1983; Mehlhorn ve Schein, 1984). Şekil 3’te *Theileria*’nın farklı formlarının şematize görüntüsü verilmiştir. Kenenin *T. annulata* etkeniyle enfeksiyonunu takiben yaklaşık 17 gün sonra kinetler hemolenf yoluyla tükürük bezi asini hücrelerine girmektedirler. Tükürük bezi asini hücreleri içinde kinetlerden çekirdek bölünmesiyle sporontlar oluşmakta, kene gömlek değiştirdikten sonra sporontlar, sporoblastlara dönüşmekte ve kenenin beslenmeye başlamasında 2-4 gün içinde sporozoitler oluşmaktadır (Gautam ve Dhar, 1983; Mehlhorn ve Schein, 1984; Levine, 1985). Sporozoitlerin omurgalı konağa inokulasyonu kenenin gelişim evrelerine, cinsiyetine göre farklılık göstermektedir. Kan emme esnasında Kenenin tükürük bezinden omurgalı konağa nakledilen sporozoitler, asinar kapağın özelliği gereği kademeli şekilde gerçekleşmektedir (Shaw, 2002).

**Şekil 3.** *Theileria annulata’*nın kene midesindeki gelişim aşamaları. **A**; merozoit (soldaki) ve sporozoit (sağdaki), **B**; kene bağırsağındaki mikrogamet ve **C**; kinet (Mehlhorn ve Schein, 1984).

* 1. **Tropikal Theileriosis’de Patogenez ve Klinik Bulgular**

Sığırlarda *Theileria* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonun şiddeti, türlerin patojenitesine göre farklılıklar göstermektedir. Bazı türler oldukça patojen olup yüksek mortaliteye sahipken (*T. annulata, T. parva*), bazı türler düşük düzeyde patojen (*T. taurotragi*),bazıları ise patojen değildir (*T. sergenti, T. buffeli, T. orientalis*). Patogenezi etkileyen en önemli evreler lenf yumrusundaki şizogoni ve eritrositleri enfekte eden merogoni olarak belirlenmiştir (Sayın ve diğerleri, 1999;2000). Retiküloendotelyal ve mononükleer sistemin aktivitesinin kısıtlandığı şizogoni döneminde, enfeksiyonun başlangıcında lökosit üretiminin yavaşladığı ve patogenezin ağırlaştığı durumlarda durduğu belirlenmiştir. Bu patolojik olay *T*. *parva*’da şizogoni, *T. annulata*’da ise hem şizogoni hem de piroplazmlarda görülmektedir (Sayın ve diğerleri, 2000;2001).

*Theileria annulata*’nın şizogoni evresinde, lenf yumrularında etkenin çoğalması, lenfatik dolaşıma giren etkenin tüm vücuda yayılması ve enfekte hücrelerde görülen metastazik özellikler patogenezde etkilidir. (Forsyth ve diğerleri, 1999). Şizontlar ile enfekte hücreler, lenfoid dokuda T lenfositlerinin kontrolsüz çoğalmasına neden olmaktadır (Gul ve diğerleri, 2015). Bunu daha sonra sitotoksik T lenfositler tarafından indüklenen enfekte lenfoblastların nekrozu izlemektedir. Şiddetli lenfositoliz sıklıkla immün baskılamaya yol açmakta ve hayvanlarda muhtemelen akciğerlerde parçalanan lenfositlerden dolayı vazoaktif maddelerin salınmasına bağlı olarak şiddetli pulmoner ödem gelişmektedir. Etkilenen lenf düğümleri, parakortikal ve kortikal bölgelerde reaktif foliküler hiperplazi, retikülo-endotelyal hiperplazi ve interfoliküler lenfoid dokuda hafif artış görülmektedir (Hassan ve diğerleri, 2012).

*Theileria annulata* enfeksiyonu, perakut, akut, subakut ve kronik seyredebilmekte ve kene tükürük bezinden salınan sporozoit miktarı, konağın duyarlılığı, ırk, yaş, gebelik gibi birçok faktörle enfeksiyon seyri değişkenlik gösterebilmektedir. (Neitz, 1957; Barnett, 1968; Flach ve diğerleri, 1995; Sayın ve diğerleri, 1999; 2000). Tropikal theileriosis’te klinik bulgular kenenin kan emmesini takiben 8-25 gün içinde görülmektedir (Levine, 1985).

Bunun yanında, tropikal theileriosise bağışıklık kazanmış hayvanlarda hastalığın klinik seyri hafif olmakta veya hiç görülmemektedir. Ancak perakut olgularda ani ölümler (3-5 gün) şekillenmektedir (Pipano, 2006). En erken tespit edilen klinik bulgulardan biri ateş olmakta ve bu durumu ateşin görülmesini takiben 1-2 gün içinde şekillenen kenenin kan emdiği ve etkeni bıraktığı taraftaki lenf yumrusunun şişmesi izlemektedir. Bu dönemde lenf yumrusu biyopsilerinde büyümüş lenf hücreleri, şizontlar ve monositik hücrelerin görülmesiyle teşhis konulabilmektedir. Yaklaşık 3 hafta boyunca pireksiya ve diğer lenf yumrularında büyüme gözlemlenir. Lenf biyopsisinde şizont görülmesinden 5-8 gün içinde piroplazmlar oluşmaktadır (Neitz, 1957; Norval ve diğerleri, 1992). Piroplasm içeren eritrositlerin parazit tarafından yıkımlanmasıyla haemopozisin bozulması sonucu şiddetli anemi görülmektedir (Hooshmand-Rad, 1976; Barnett, 1977; Uilenberg, 1981). Hastalığın ilk evrelerinde dışkı normal kıvamda iken hastalığın şiddetinin artmasıyla koyu siyah renkte, yapışkan kıvamda ve katran görünümü kazanmakta, ayrıca kan ve mukus da görülebilmektedir (Barnett, 1977; Uilenberg, l981; Pipano, 1994; Sayın ve diğerleri, 2000).

**2.8. Tropikal Theileriosiste Bağışıklık**

*Theileira annulata* enfeksiyonuna karşı omurgalı konakta hem humoral hem de hücresel bağışıklık gelişmektedir. Bu durumun şekillenmesinde etkenin omurgalı ve omurgasız konaktaki farklı formları etkili olmaktadır (Boulter ve Hall, 1999). Enfeksiyona karşı gelişen bağışık yanıtta, enfeksiyona sebep olan etkenin türü ve alınan parazit yüküde etkilidir. Tropikal theileosis’e karşı gelişen bağışıklıkta T hücreler, sitotoksik T hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreleri, makrofajlar ve yardımcı T hücreleri enfeksiyona karşı bir immun yanıt oluşturmaktadır (Preston ve diğerleri, 1999). Hastalığı atlatan hayvanlarda homolog suşlarla re- enfeksiyona karşı tam bağışıklık gelişirken, heterolog suşlara karşı tam bir bağışıklık gelişmemektedir (Hall, 1988).

Doğal dirençte Toll-like reseptörler (TLR) önemli rol oynamaktadır. Bu reseptörler birçok patojene karşı doğal direncin oluşmasını sağlayan tip 1 transmembran proteinleridir. Makrofajlar, mast hücreleri, dentritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, eozinofiller, öldürücü T hücrelerinde bulunurlar. Sığır theileriosisi üzerine yapılan bir çalışmada TLR-10’un parazit virülensinde önemli bir etkiye sahip olduğu, yapılan başka bir çalışmada düşük ve yüksek pasajlardaki virülens ve atenüasyon ölçümlerinde parazitin membranındaki TLR-10 miktarının değiştiği ortaya konulmuştur (Haghparast ve diğerleri, 2010; Jensen ve diğerleri. 2005; Jones ve diğerleri. 2001; Ververken ve diğerleri. 2008)

Parazitin omurgalı ve omurgasız konaktaki formları bağışıklık oluşmasında, etkenle ilk enfeksiyonda iyileşme ve re-enfeksiyon durumlarında direnç gelişmesine etki etmektedir. Hastalığa ilk defa yakalanan hayvanlarda doğal öldürücü hücreler, makrofajlar, sitokinler enfekte hücreler üzerinde baskılayıcı etki göstermektedir. Aynı şekilde nitrit oksit üretimi makrofajların CD4+ hücreleri tarafında uyarılması ile artmakta ve şizontların öldürülmesine sebep olduğu gibi omurgalı konakta apoptozise de neden olmaktadır. Re-enfeksiyona karşı dirençte NK hücreleri erken immun yanıttan kurtulan parazitler üzerine etki ederken, merozoit evresinde makrofajlar aktive olmaktadır (Preston ve Brown, 1985; Preston ve Jongejan, 1999).

**2.9. Tropikal Theileriosisin Tanı**

**2.9.1. Klinik ve Mikroskobik Tanı**

Tropikal theileriosis’in endemik bölgelerdeki tanısı kene varlığı, klinik ve makroskobik bulgularla yapılabilmektedir. Ayrıca Giemsa boyama ile hazırlanan lenf yumrusu ve karaciğer biyopsilerinde şizont varlığı ile kan frotilerinde piroplazmik formlarının görülmesi ile tanı konabilmektedir (Göksu, 1985; Pipano, 1994). Ancak mikroskobik incelemede hastalığın perakut ve kronik seyrinde tanı zor olmakla birlikte lenf yumrusu preparatlarında makroşizontların azurofilik granüllerle karıştırılması, kan frotilerinde piroplasmların diğer *Theileria* türleriyle karıştırılması gibi dez avantajları vardır (Lawrence ve diğerleri, 1994; Anon, 1984). İyileşen hayvanlar taşıyıcı olarak kalmakta ve bu durum etkenin vektör keneye naklinde önemli bir fırsat oluşturmaktadır (Brown, 1990).

**2.9.2. Serolojik Tanı**

İndirek Floresan Antikor testi (İFAT) ile theileriosise karşı gelişen antikor tespiti yapılmaktadır (Burridge ve Kimber, 1973). Bu yöntemin, Giemsa boyama yöntemine kıyasla daha duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Dhar ve Guatam, 1977; Darghouth ve diğerleri, 1996). Ancak İFAT yönteminde diğer *Theileria* türleri ve apikompleksa parazitlerinden *Babesia* spp ve *Anaplasma* spp ile çarpraz reaksiyon vermesi yanıltıcı sonuçlara neden olmaktadır (Burridge ve diğerleri, 1974; Kocan ve diğerleri 2000; Molad ve diğerleri, 2006). Ayrıca çok fazla örneği kapsayan epidemiyolojik çalışmalarda kolay uygulanamaması da dezavantajlarında biridir (Kiltz ve diğerleri, 1986; Burridge ve diğerleri, 1974). Bunun yanında, parazitin omurgalı ve omurgasız konaktaki farklı formlarına karşı gelişen; sporozoit yüzey antijeni; SPAG-1 (Hall ve diğerleri, 1992; Williamson ve diğerleri, 1989), merozoit rhoptri antijeni; Tamr-1 (Shiels ve diğerleri, 1994), merozoit ve piroplasm yüzey antijeni; Tams-1 (Shiels ve diğerleri, 1995), *T. annulata* yüzey antijeni; TaSP (Schnittger ve diğerleri, 2002; Renneker ve diğerleri, 2009; Mohamed ve diğerleri, 2012), şizont yüzey antijeni; TaD (Schneider ve diğerleri, 2004), şizont proteini; TaSE (Schneider ve diğerleri, 2007), mitokondriyal HSP70; TamtHSP70 (Schnittger ve diğerleri, 2000), *T. annulata* paralog aile antijeni; Ta9 (Bilgiç ve ark, 2016) gibi antijenleri ELİSA testlerinde kulanılmaktadır.

**2.9.3. Moleküler Tanı**

Molekülünün genetik teknolojisinden yararlanarak sığır ve kenedeki parazit DNA’sının belirlenmesi tanıda önemli bir yol kat edilmesine sebep olduğu gibi %100’e yakın oranda var olan enfeksiyonun doğrulanmasına olanak sağlamıştır (Dana ve Nathans, 1971; Caskey, 1987; Wilson, 1991; Norval ve diğerleri, 1992; İlhan, 1995). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle *T. annulata* major yüzey proteini (Tams-1) (d'Oliveira ve diğerleri, 1995; Martin-Sanchez ve diğerleri, 1999; Kirvar ve diğerleri, 2000), ısı şok protein 70 (HSP70; heat shock protein 70) (Shayan ve diğerleri, 1998), beta tubulin (ß-tubulin) (Caccio ve diğerleri, 2000) ve mitokondriyal sitokrom (Criado ve diğerleri, 2006; Bilgiç ve diğerleri, 2010) gibi farklı genlerin çoğaltılarak tanı konmasına imkan vermiştir. PZR tekniği mikroskobik tanı, İFAT, ELİSA’ya kıyasla daha duyarlı olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Vatansever ve Nalbantoğlu, 2002).

Diğer bir moleküler teşhis yöntemi ise restriksiyon enzimi ile kesilen bölgelerinin boyut farklılıklarının belirlenmesinde kullanılan DNA problarıdır. Bu yöntemle yapılan bir çalışmada *T. parva*’nın şizont ve enfekte hücre kültüründen elde edilen izolatlar DNA problarıyla incelenmiş ve izolatlar arasında antijenik farklar tespit edilmiştir (Bishop ve diğerleri, 1994).

Loop-mediated izotermal amplifikasyon (LAMP) tekniği DNA’nın izotermal şartlar altında yüksek spesifite, yüksek etkinlik ve hız ile amplifiye edildiği yeni bir yöntem olarak son yıllarda geliştirilmiştir (Notomi ve diğerleri, 2000; Nagamine ve diğerleri, 2002). *T*. *annulata* ile enfekte hücre kültürlerinden izole edilen genomik DNA’nın (Salih ve diğerleri, 2008) ve saha şartlarındaki örneklerin tespitinde başarı ile kullanılmıştır (Bilgiç ve diğerleri, 2017).

**2.10. Tropikal Theileriosis Tedavisi**

Theileriosisin tedavisinde yaygın olarak kullanılan buparvaquone parazitin elektron taşıma sistemine etki etmektedir (Dhar ve diğerleri, 1986; Dolan ve diğerleri, 1992; Singh ve diğerleri, 1993). Hastalığın erken evresinde 2,5 mg/kg kas içi (IM) uygulama hem şizont hem de piroplasm formuna karşı etkili olmaktadır. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde ise ikinci bir doza ihtiyaç duyulmaktadır (McHardy ve diğerleri, 1987; Dolan ve diğerleri, 1992; Singh ve diğerleri, 1993). Ancak buparvaquone’nun yaygın kullanımı, ilaca karşı direnç gelişmesine ve tedavide etkin bir yanıt alınamamasına sebep olabilmektedir (Mhadhbi ve diğerleri, 2010; Sharifiyazdi ve diğerleri, 2012). Son yıllarda yapılan bir çalışmada histondeasitelaz inhibitörleri (HDACi) olan vorinostat, romidepsin, belinostat ve panobinostat etken maddelerinin apikompleksan parazitlerden özellikle *Toxoplasma gondii* ve *Plasmodium* spp’de antiparazitik etkiye sahip olduğu ve *T. annulata*’nın şizont formunda anti-theilerial özellik gösterdiği buna bağlı olarak parazitin metastaz aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (Barman ve diğerleri, 2021).

**2.11. Tropikal Theileriosiste Koruma ve Kontrol**

Sığırlarda tropikal theileriosise bağlı mortalite ve verim kaybı sonucunda oluşan ekonomik kayıpları engellemek amacıyla kullanılan yöntemler arasında vektör kene mücadelesi, dirençli sığır ırklarının kullanılması ve aşılama oldukça önemlidir. Aynı zamanda hayvan hareketlerinin kontrol altına alınması, bakım ve barınma koşullarının iyileştirilmesi koruma ve kontrole katkı sağlamaktadır.

**2.11.1. Vektör Kene Mücadelesi**

Tropikal theileriosisin endemik görüldüğü bölgelerde vektör keneler ile mücadele oldukça önemlidir (Brown, 1990). Keneyle mücadelede farklı akarisid ilaçlar kullanılmakta ve bu ilaçlar banyo, sprey ve sırta dökme preparatlar tarzında uygulanmaktadır. Uygulanan ilaçlar; organik fosforlu bileşikler (triklorfon, foksim, kumafos), piretroidler (deltametrin, sipermetrin, flumetrin) ve formamidinlerdir (amitraz). Vektör kene türünün omurgalı konaktan kan emme süresi ilaçlama açısından önemlidir (Pipano, 1989). Ayrıca et ve sütte kalıntı bırakmamasına dikkat edilmeli ve sürekli aynı akarisit kullanımı sonucu kenede oluşabilecek ilaç direnci göz önünde tutulmalıdır (Tait ve Hall 1990; Norval ve diğerleri, 1992). Hayvanların otlatıldığı meraların mevsimsel olarak nadasa bırakılması, kenelerle biyokontrol yöntemli mücadele amacıyla kuşlar, parazitoidler, entomopatojenik nematodlar, entomopatojenik funguslar ve bakterilerin kullanılması da kenelerle mücadelede kontrol yöntemleri arasındadır (Abdela, 2016; Amira ve diğerleri, 2018; Gharbi ve Darghouth, 2015; Demessie ve Derso, 2015). Ayrıca hayvanların barındığı ahır ve barınaklardaki yarık ve çatlakların kapatılması, bu alanlarda kene üremesini engellemektedir.

**2.11.2. Dirençli Sığır Irkları Seçilmesi**

Tropikaltheileriosis genellikle duyarlı hayvanlarda ölümcül olarak seyredebilmekte ve verimi arttırmak amacıyla endemik bölgelere ithal edilen saf Avrupa Holstein gibi sığırlarında yerli ırklara göre morbidite ve mortalitesi daha yüksek olmaktadır (Purnell, 1978; Hashemi-Fesharki, 1988; Brown, 1990; Oudich ve diğerleri, 1993). Mevcut kontrol yöntemleri arasında hücre kültürü aşıları, buparvaquone ile tedavi ve vektör kene mücadelesi yöntemleri *T. annulata*’nın endemik olduğu bölgelerde yetersiz kalabilmekte ve bunun yanında uygulamaları zor ve maliyetli olabilmektedir (Tait ve Hall, 1990; Hashemi-Fesharki, 1991; Boulter ve Hall, 2000; Minjauw ve de Castro, 2000). Bu gibi dezavantajların önüne geçilebilmesi amacıyla tropikal theileriosis’den korunmada bu enfeksiyona genetik olarak direnç gösteren sığırların kullanılması alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, Hindistan'daki süt sığırı işletmelerinde ithal hayvan kullanımını azaltarak tropikal theileriosis prevalansında azalma sağlanmıştır (Minjauw ve McLeod, 2003).

*Theilera annulata* sporozoitlerinin farklı dozlarda kullanılmasıyla deneysel enfeksiyon oluşturulan bir çalışmada Sahiwal sığırları (*Bos indicus*) ve Kenana sığırları (*Bos taurus*), Holstein gibi ithal ırklara kıyasla *T. annulata'*ya göreceli olarak direnç göstermiştir. Sudan’da yapılan bir çalışmada, Kenana ırkı ve Friesian ırkı sığırlar *T. annulata*’nın letal dozları ile enfekte edilmiş Kenana ırkı sığırlar hastalığa karşı daha fazla direnç göstermiş ve bu durumda lenfoid doku hasarının bu hayvanlarda daha az olması ile ilişkilendirilmiştir (Preston ve diğerleri, 1992a; Preston ve diğerleri, 2002; Bakheit ve Latif, 2002). Sığır ırkları arasındaki direnç farklılıklarının nedeni tam olarak açıklanamazken, pro-inflamatuar sitokinlerin, interlökin-1 (IL-1), IL-6 ve tümör nekroz faktörü-α'nın (TNFα) üretiminin artması tropikal theileriosis patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada bu sitokinlerin, *in vitro* ortamda *T. annulata* ile enfeksiyonun ardından makrofajların artmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Brown ve diğerleri, 1995; McGuire ve diğerleri, 2004).

Diğer bir önemli nokta ise tropikal theileriosise vektörlük yapan kenelere karşı dirençli sığır ırklarının yetiştirilmesidir. Çok sayıda çalışmada, yerli *Bos indicus* ırkı ve melezlerinin, Avrupa *Bos taurus* ırklarından Afrika’daki kene türlerine karşı daha dayanıklı olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca dirençin sadece ırklar arasında değil, aynı zamanda kene türleri arasında da önemli ölçüde değiştiğini ve bu nedenle tutarsız olduğu bildirilmiştir (Moran ve diğerleri, 1996).

**2.11.3. Aşılama**

Theleriosisten korunmada en etkili yöntemlerden biri aşılamadır. *T. parva*’ya karşı hayvanlara uygulanan “enfeksiyon ve tedavi” yöntemi enfekte kenelerden alınan sporozoitlerin kontrollü olarak sağlıklı hayvanlara verilmesi, verilen sporozoitlerin gelişimini baskılamak amacıyla uzun etkili oksitetrasiklinlerin kullanılması esasına dayanmaktadır. Buna bağlı olarakta hayvanlarda theileriosise karşı bağışık yanıt gelişmekte ve uzun süre koruyuculuk sağlamaktadır (Morrison, 2015; Kahn ve Line, 2010). Bunun yanında, tropikal theleriosisten korunmada aşı denemeleri 1930'lu yıllarda Cezayir’de *T. annulata*’nın düşük virülense sahip saha izolatları ile enfekte hayvanlardan alınan kanların, enfeksiyondan korumak amacıyla diğer hayvanlara inokulasyonu ile başlamış ve bunu takiben 1960'lı yıllarda *T. annulata* şizontları ile enfekte sığır mononükleer hücrelerinin *in vitro* olarak canlılıklarını koruyabildiklerinin belirlenmesi parazite karşı atenüye canlı aşıların geliştirilmesindeki en önemli basamağı oluşturmuştur (Onar, 1989; Pipano, 1989a, 1989b; Brown, 1990). *İn vitro* ortamda atenüye edilmiş şizontlar ile enfekte mononükleer hücreler kullanılarak üretilmiş aşılar günümüzde yaygın olarak İsrail, İran, Rusya, Türkiye, İspanya, Tunus ve Çin gibi birçok ülkede hastalığın kontrolünde kullanılmaktadır (Pipano ve Tsur, 1966; Hashemi Fesharki, 1988; 1998; Stepanova ve Zablotsky, 1989; Sayın ve diğerleri, 1997; Viseras ve diğerleri, 1997; Darghouth, 2008; Zhang, 1997).

Atenüye canlı aşılar, şizontla enfekte sığır lenfosit hücrelerinin hücre kültüründe uzun süre pasajlanıp patojenitesini (Tsur ve Pipano, 1966) ve merozoit oluşturma kabiliyetinin zayıflatılması ile oluşmaktadır (Onar, 1989; Pipano, 1989a; 1989b; Brown, 1990). Bir hücre kültürünün atenüasyonu pasaj sayısı ile doğru orantılı olmakla birlikte, yüksek pasajlarda atenüasyonun daha iyi geliştiği bildirilmiştir (Ouhelli ve diğerleri, 1989; Ilhan, 1995). Atenüasyon amacıyla hücre hatlarının pasajlanması ilgili izolatların patojenitelerinin ve merozoitlere farklılaşma kabiliyetlerinin zayıflatılmasına neden olmaktadır (Hall ve diğerleri, 1999; Shkap diğerleri, 2006; Sommerville diğerleri, 1998). Pasajlama ile beraber hücre hatlarındaki bazı gen bölgelerinin ekspresyon seviyeleri değişikliğe uğramakta, hücre yüzeyinde yerleşim gösteren ve patojenite ile ilişkili bazı antijenlerin ekspresyon seviyelerinin azalarak genotipik düzeyde bir seleksiyon meydana gelmektedir (Sutherland ve diğerleri, 1996; Hall diğerleri, 1999). Yüksek pasajlı hücre hatları ile yapılan aşılamalar sonucunda oluşan uzun süreli koruyucu bağışıklık aynı zamanda aşılamada kullanılan hücre hatlarının piroplazmlara farklılaşma kabiliyetlerini yitirmelerinden dolayı aşı suşlarının kenelere aktarılmasınında önüne geçilebilmektedir (Ouhelli ve diğerleri, 1989; Ilhan, 1995). Ancak bu hücre hatlarıyla aşılanan hayvanlarda piroplazm formunun şekillenmemesine karşın enfekte kenenin kan emmesiyle piroplazm formlarının oluşabileceği bildirilmiştir (Pipano 1989a; Pipano ve diğerleri, 1991). Yüksek pasajlı hücre kültürlerinin, daha düşük pasajlı hücrelere oranla T lenfosit uyarımı ve üretilen sitokin düzeyinin hastalığın şiddetini daha az indüklediği görülmüştür (Brown 1997; Brown ve diğerleri, 1998). *T*. *annulata* Ankara suşundan hazırlanan aşının dondurma, saha şartları ve çözdürme sırasındaki kayıplar düşünüldüğünde bir doz 107 hücre olacak şekilde hazırlanması uygun bulunmuştur (Özkoç ve Pipano, 1981; Onar, 1989; Sayın ve diğerleri, 2005; Pipano, 1989; Singh, 1990; Zhang, 1990; Zabrosky, 1990; Sayın ve diğerleri, 2004). Türkiye’de atenüye şizont aşısının etkinliğinin araştırıldığı birçok çalışma vardır. Nalbantoğlu (1998), 58 adet farklı yaş grubundaki hayvanların atenüye şizont aşısı uygulaması sonucu seropozitiflikleri IFAT testi ile araştırılmıştır. Aşıların koruyuculuğu üzerine yapılan bu çalışmada genç hayvanlarda daha fazla ve uzun süre koruma sağlandığı bildirilmiştir (Nalbantoğlu, 1998). Deneysel olarak enfkte edilen aşılı hayvanlardan (n:10) biri tedaviye rağmen ölmüştür. Bu durum aşının %100 koruyuculuk sağlamadığını göstermektedir (Aysul ve diğerleri, 2008). Ilhan (1995), düşük pasaj hücre kültürlerinde birden fazla parazit popülasyonu olduğunu, yüksek pasaj hücre kültürlerinde ise tek bir parazit popülasyonu olduğunu bildirmiştir. Bu durum, pasajlamanın çok uzun sürdürülmesi halinde hücrelerin patojeniteleri ile birlikte aşının koruyuculuğunuda azalttığını göstermektedir (Pipano ,1989; Wenshun ve Hong, 1994).

Theileriosisin lenfoproliferatif ve hücre transformasyonu karakterinde olması ayrıca patolojisinde şizont ile enfekte konak hücrelerdeki metastazik davranışlar kanser hücrelerine benzetilmektedir (Forsyth ve diğerleri, 1999). Bu metastazik davranışların şizont ile enfekte konak hücredeki matriks metallopreteinaz (MMPs) aracılığı ile gerçekleştiği tespit edilmiş olup *Theileria*’da 7 farklı konak matriks metalloprotein aktivitesi olduğu ve bunlardan en büyük aktiviteyi MMP9’un sağladığı belirlenmiştir (Adamson ve diğerleri, 2002; Howard ve diğerleri, 1995; Somerville ve diğerleri, 1998).

Theileriosis’de metastazik olaylar parazitin konak hücre sinyal yollarını inhibe etmesi, bunun sonucunda da enfekte hücrenin farklılaşması (transformasyona uğraması), transformasyona uğrayan enfekte hücrenin apoptozisi üzerine etki ve enfekte konak hücrenin metastazı şeklinde dört basamağa ayrılmaktadır (Lizunda, 2006; Dobbelaere, 1999; Shiels, 2006; Akoolo, 2008).

*Theileria* şizontları ile enfekte lenfoid hücrelerde meydana gelen transformasyon, C-JunN-Terminal kinaz (JNK)ve aktivasyon protein-1 (AP-1) transkripsiyon faktörünün aktivasyonuyla oluşmaktadır. JNK’lar birçok hücre içi biyokimyasal sinyalleri yöneterek çoğalma, gelişme, farklılaşma, apoptozis ve transkripsiyon gibi işlevlerde rol alarak erken gen sentezine ve sonucunda çeşitli stres sinyallerine yanıt vermektedir (Lizunda ve diğerleri, 2006). AP-1’in aktivasyonunun esas rolü, MMP9’un sentezini indüklemesidir. Matrix metalloproteinleri *T. annulata* ile enfekte hücrelerin yayılmasında rol oynayarak (Dobbelaere ve diğerleri, 1999) enfekte hücrelerin metastazik özellik kazanmasını sağlamaktadır. Metastazik özellik sayesinde hücre daha rahat hareket ederek, metastaz yapacağı diğer hücrelerdeki MMP9’u sentezini arttırarak sağlam hücreye invazyonu kolaylaştırmaktadır (Heussler ve diğerleri, 2002; Howard ve diğerleri, 1995). Atenüye canlı aşılarda ise, adezyon ve MMP9 ekspresyon düzeyleri azalmakta ve eşzamanlı olarak AP-1 aktivasyonu kaybolmaktadır. Matriks metalloproteinazların önemli rollerinden biri de ekstrasellüler matriks (ECM) üzerine etkisidir. ECM, ekstraselüler alanda hücrelere fiziksel destek sağlayan dahası doku sınırlarını belirleyen yapıdır. ECM'nin bozulması, büyüme faktörlerinin işlenmesi ve hücre adezyon moleküllerinin aktivasyonu yoluyla hücreler çevresel değişimlerle mutasyona uğramaktadır. Bu durum kanser hücrelerinin çoğalması ve invazyonu için en temel etkendir. MMP'ler bu süreçte önemli bir rol oynamaktadır. MMP ile ilişkili bir metalloproteinaz ailesi olan ADAM (Yıkımlayıcı ve Metalloproteinaz- A) protein ailesi diğer transmembran proteinlerin proteolitik işlenmesinde, hücre yapışmasında ve hücre sinyal yollarında yer alan proteinlerdir. ADAM ailesinde iki grup vardır; (i) hücre membranına bağlı ADAM ve (ii) salgılanan tip ADAM-TS (ADAM ve Trombospontin Motifleri). ADAM üyeleri, propeptit, metalloproteinaz, disintegrin, sistein açısından zengin ve epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri, transmembran ve sitoplazmik alanlardan oluşmaktadır (Şekil 4). Proteinaz tip ADAM üyeleri (ADAM8, -9, -10, -12, -15, -17, -19, -20, -21, -28, -30 ve -33) MMP üyeleriyle ortak bir 'Met-dönüşü' gen bölgesi içermektedir (Mochizuki ve Okada, 2007). MMP'ler gibi, ADAM'lar da ECM moleküllerini parçalayabilmekte ve bu nedenle kanser hücrelerinde metastaza yardımcı olmaktadır.



**Şekil 4.** Bir parçalayıcı ve metalloproteinazın (ADAM) etki alanı yapıları. CR, sistein açısından zengin alan; CT, sitozolik kuyruk; Dis, parçalanma alanı; E, epidermal büyüme faktörü benzeri alan; MP, metalloproteinaz alanı; Pro, propeptit alanı; TM, transmembran alanı ifade etmektedir (Mochizuki ve Okada, 2007).

*Theileria* ile enfekte makrofajlarda ADAM-19 geni membrana bağlı TNF (Tümör nekroz faktörü; sistemik inflamasyonda yer alan bir hücre sinyal proteini)’nin salınımını arttırmakta ve dönüştürmektedir (Franza ve diğerleri, 2013; Zheng ve diğerleri, 2004). ADAM'lerin aktiviteleri, MMP'lerin endojen inhibitörleri olan metallopteinaz doku inhibitörleri (TIMP) tarafından inhibe edilmektedir (Baker ve diğerleri, 2002). Ancak, ADAM-8, ADAM-9 ve ADAM-19, herhangi bir TIMP tarafından inhibe edilememektedir (Amour ve diğerleri, 2002; Chesnenau ve diğerleri, 2003). Bu sınırlı inhibitör aktivitesi nedeniyle çeşitli sentetik inhibitörler geliştirilmiştir. ADAM-8 ve ADAM-19'un katalitik aktivitesi, MMP'nin sentetik inhibitörü hidroksamik asit tipi inhibitör BB94'e (Batimastat) duyarlıdır (Chesnenau ve diğerleri, 2003, Schlomann ve diğerleri, 2002). Özet olarak, ADAM'ler, furin (proteinleri aktive eden proteaz enzimi) veya MMP'lerin veya diğer yolların etkisiyle aktive olanlar ve aktif olmayan pro-ADAM'lar olarak sentezlenmektedir. Sentezlendikten sonraki görevleri ise, heparin bağlayıcı-epidermal (HP-EGF) ve dönüştürücü (TGF-α) gibi büyüme faktörlerinin değiştirilmesidir. Bu durum kanser hücrelerinin yüzeylerindeki sinyalleri değiştirebilmekte, bu da otokrin ve parakrin mekanizma ile hücre proliferasyonunun artmasına neden olabilmektedir. Ayrıca, ADAM'lerin sheddaz aktivitesi (zardan geçen proteinlerin hücre dışı kısımlarını parçalayan membrana bağlı enzim), protein kinaz C (PKC) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu aracılığıyla olduğu gibi hücre sinyalizasyonuna yardımcı olmakta ve hücrenin substratları sindirmesine aracılık eden moleküllere bağlanarak yapışma molekülleri olarak işlev görmektedir (Mochizuki ve Okada, 2007).

Metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP) 184–194 amino asit uzunluğunda olup N- ve C- terminal uçlarında üç korunmuş disülfid bağı içermekte ve TIMP-3 özellikle B lenfositlerden eksprese edilmektedir (Gross ve diğerleri, 1962). N-terminal ucu özellikle matriks metalloproteniazları (MMP) yıkıcı özelliğe sahiptir. MMP’ler *T. annulata* ile enfekte hücrelerin invazyon ve metastazik özellik kazanmasına katkı sağlamaktadır (Rundhaug, 2003). AP-1 transkripsiyon faktörü Jun ailesinin üyelerinden oluşan bir molekül kompleksidir. C-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü-2 (ATF-2), hem *T. annulata* hem de *T. parva* ile enfekte lökositlerde aktive edilmektedir (Chaussepied ve diğerleri, 1996; Galley ve diğerleri, 1997; Botteron ve diğerleri 1998; Chaussepied ve diğerleri, 1999). JNK aktivasyonu, *Theileria* ile enfekte olmuş lökositlerin canlılığını, proliferasyonunu ve metastazını desteklemektedir (Lizundia ve diğerleri, 2005; 2006; 2007).

MMP’ler gibi *Theilera*’nın metastazına destek olan bir diğer gen bölgeside histon deasetilaz (HDAC)’dır. HDAC geni ökaryotlarda, gen transkripsiyonu, hücre büyümesi, hayatta kalma ve proliferasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynamakta ayrıca anormal ekspresyonları veya aktiviteleri kanser gelişimine yol açmaktadır (Gallinari ve diğerleri, 2007; Li ve Seto, 2016). Protein kinaz A (PKA) ve Kazein kinaz 2 (CK2) proteini birçok HDAC izotipleri için anahtar bir enzim görevi görmektedir. CK2 ökaryot hücrelerin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde yer almakta ve hücre büyümesi, hayatta kalma ve hücre proliferasyonu ve transkripsiyonda kromatinin yeniden şekillenmesinde görev almaktadır (Pflum ve diğerleri, 2001; Zhang ve diğerleri, 2005; Meggio ve diğerleri, 2003; Guo ve diğerleri, 1999). Ayrıca CK2'nin anti-apoptotik işlevi, kanserli hücrelerin apoptozisini engellemekte ve çoğalmaya devam etmesine izin vermektedir. Birçok insan kanserinde ve deneysel tümörde sürekli olarak yüksek bulunmuştur ve düzensiz ifadesinin tümör oluşumuna katkıda bulunduğu ve onkojenik potansiyel kazandırdığı gösterilmiştir (Unger ve diğerleri, 2004).

Pürin ve pirimidin nükleotidlerinin biyosentezi, DNA ve RNA'nın doğrudan öncüleri oldukları ve sıklıkla enzimatik reaksiyonlarda ko-enzimler olarak yer aldıkları için tüm hücreler için çok önemli bir süreçtir (Korn ve diğerleri, 1955; Kornberg ve diğerleri, 1955). Nükleotid dönüşümü yoluyla serbest pürin ve pirimidin bazlarının dönüşümünü hipoksantin fosforibosiltransferaz (HPRT) ve adenin fosforibosiltransferaz (APRT) enzimleri omurgalılarda bu aktiviteleri katalize eder. Bu nedenle HPRT geni, mutasyon ajanlarının araştırmalarında en aktif olarak çalışılan gen olmaktadır. HPRT, gen ekspresyonundaki mutasyonları değerlendiren moleküler çalışmalar için endojen bir kontrol olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Gen bölgesindeki eksiklik, mutasyona sebep olmaktadır. *T. annulata* ile enfekte olmuş sığır lenfositlerinde parazit yükünün değerlendirilmesini sağlamaktadır (Nguyen ve diğerleri, 2011).

Isı şok proteinleri (HSP) stres proteinleri olarakta bilinmektedir. Stres altında bu prıoteinlerin sentezi artmaktadır (Moseley, 2000). Stres oluşturan faktörlerin etkisi altında proteinlerde katlanmalar ve açılmalar meydana gelmektedir. Bu proteinler karşı karşıya geldiklerinde yapışmalar olabilmekte ve bu durum proteinleri fonsiyon dışı bırakmaktadır. HSP’ler bu yapışma ve kümeleşmeyi engelleyici rol oynamaktadır. HSP90 proteinin en fazla sitoplazma ve endoplazmik retikulumda bulunmaktadır. Hücre dışındaki HSP’leri enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmakta görev almakta ayrıca antijen sunulmasında da önemli rol oynamaktadır (Pocley, 2001; Laad ve diğerleri, 1999). Stres proteinlerine karşı gelişen immun yanıt çapraz reaksiyonlar nedeniyle hücrenin kendisine karşıda reaksiyon oluşmasına neden olabilmektedir. Theileriosis enfeksiyonunda bu genin ekspresyonun arttığı bildirilmiştir (Mason ve diğerleri, 1989).

Atenüasyonun artması AP-1 aktivitesinin kaybına ve bunlara bağlı olarak adezyon ve MMP9 espresyonunun azalmasına neden olmaktadır. AP-1 hedef genleri olan CD69, CD49, ITGB-5 ve ICAM-1 gibi proteinlerinde ekspresyon düzeyleri atenüasyon düzeyi arttıkça, azalmaktadır (Adamson ve diğerleri, 2000; Berberich ve diğerleri, 1994; Metheni ve diğerleri, 2014).

Enfeksiyon varlığında lökositlerin yangısal bölgeye göçü, adezyonu, reseptör ligand ilişkisi kurması ve antijen tanıması bir β2 integrin LFA-1'in (aLb2 veya CD11a-CD18) ligantıolan ICAM-1 molekülünün yangısal sitokinler tarafından ekspresyonunun artmasıyla olmaktadır (Springer, 1994; Alon ve Rey, 2008; Rothlein ve diğerleri, 1986; Dustin ve diğerleri, 1986). İnterlökin-1 (IL-1) ve interferon-gama (IFN-g) ICAM-1 ekspresyonu seviyesini transkripsiyonel olarak arttırmaktadır. ICAM-1, doku makrofajları ve dendritik hücreler dahil olmak vasküler endotelyal hücreler, timik ve mukozal epitelyal hücreler ve dermal fibroblastlar gibi hematopoietik olmayan hücrelerde de eksprese edilmiştir (Dustin ve diğerleri, 1986). Endotelyuma bağlanan T hücreleri üzerindeki kemokinler, LFA-1'i indüklemekte, böylece ICAM-1'e adezyonu sağlamaktadır (Shamri ve diğerleri, 2005). Bu nedenle, ICAM-1 T lenfosit yanıtında fazla eksprese edilmektedir. İnsanlardaki Rinovirus, *Plasmodium falciparum* gibi enfeksiyonlarda, etkenler ICAM-1'e bağlanmakta, sağlıklı hücrelere adezyonu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca immun yanıta neden oldukları için ICAM-1 ekspresyonunu attırmaktadır (Kyes ve diğerleri, 2001; Berendt ve diğerleri, 1989).

İntegrin beta-5 (ITGB-5) geni tarafından kodlanan ITGB-5 proteini mukoza epitel hücrelerinin dökülmesini etkileyerek bakteriyel enfeksiyona karşı doğal immun yanıtta önemli bir rol oynayan αVβ₅ proteinin bir parçasıdır. αVβ₅ matriks makromoleküllerine ve proteinazlara bağlanan, böylece anjiyogenezi uyaran bir integrin türüdür. Ayrıca, anjiyogenezi inhibe edebilmektedir. Integrin alfa V ve integrin beta 5 olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır (Kim ve diğerleri, 2009) İnsanlarda αVβ₅’in hücrelere bağlanması, yapısında arginilglisilaspartik asit (Arg-Gly-Asp) olan vitronektin (Vn) endositik reseptörün varlığı ile gerçekleşmektedir. Arg-Gly-Asp, fibronektinin hücre adezyon moleküllerine bağlanması ve trombosit agregasyonunu ve fibrinojen bağlanmasını inhibe edebilmektedir (Finnemann ve diğerleri, 1997; Memmo ve McKeown-Longo, 1998; Mousa ve diğerleri, 1999). Vn, konak hücrelerinin sinyalleşmesinin aracılık ettiği bakteriyel direnci, adezyon gibi önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, bakteri ve epitel hücreleri arasındaki çapraz bağlantı gibi patojenler ve epitel hücreleri için farklı bağlanma bölgelerine sahiptir (Singh ve diğerleri, 2010). Vn, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae*’nin epitel hücrelerine daha fazla bir bakteri adezyonunu sağlamaktadır (Chhatwal ve diğerleri, 1987). Ayrıca ITGB-5 polimorfizmlerinin insanlarda adenovirüs enfeksiyonunu etkileyebilecek ve akciğer fonksiyonlarını azaltabilecek konakçı faktör olduğu bildirilmiştir (Kasuga ve diğerleri, 2009).

Farklılaşım kümesi (CD; cluster diferantation) üyeleri immun sistem hücrelerinin işlevi için reseptör veya ligand olarak hareket etmektedir. CD üyeleri hücre sinyalleşmesinde rol oynamakta, diğer CD proteinlerinin hücre adezyonuna aracılık etmektedir. CD üyeleri yaygın olarak hücre belirteçleri olarak kullanılmakta ve hücrelerin hangi bağışıklığın tepkisi olduğu hakkında bilgi vermektedir. Örneğin; Anti-CD3 T lenfositlerin belirteci olarak kabul edilirken, CD19 ve CD20 genellikle B lenfosit belirteçleri olarak tanımlanmaktadır (Xiong ve Xu, 2014). CD69 ise tip 2 integrin membran protenidir (Testi ve diğerleri, 1994). Dinlenme durumunda T-lenfositlerde ve doğal öldürücü (NK) hücrelerde indüklenen hücre yüzeyi repertörlerinden biridir (Zeigler ve diğerleri, 1994). Alfa-4 integrin subuniti olan CD49d, fibronektin (FN) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1'e (VCAM-1) bağlanarak etkinlik göstermektedir. Ayrıca farklı CD hücre markerlarının adezyonuna öncülük ettiği bildirilmiştir (Gattei ve diğerleri, 2008; Shanefelt ve diğerleri, 2008; Winceht ve diğerleri, 1996; Dal-Bo ve diğerleri, 2009). Kronik lenfositik lösemili insanlarda CD49d markerı %40 oranında tespit edilmiştir. Hastalık patogenezinde önemli bir rol oynayan CD49d, lökositlerin kan-beyin bariyeri yolu ile göçünden sorumludur (Boing ve diğerleri, 2008; Zahron ve diğerleri, 2008). *T. annulata*’nın şizogoni evresinde CD49d (VLA-4; Very Late Antigen)’ün hücre adezyonunu desteklediği bildirilmiştir. *T. annulata* ile enfekte olmuş hücrelerin CD2, CD11b ve CD49d’yi eksprese etmesi (lökosit adezyonu ve göçünde önemli rol alan moleküller) şizont ile enfekte olmuş hücrelerin diğer hücreleri de enfekte etmesinin temel nedeni olarak görülmektedir. Aynı zamanda konak vücudunda metastazdan sorumlu olan MMP9’un salgılanmasının bu hücreler tarafından desteklendiği bildirilmiştir (Bevilacqua, 1993; Baylis ve diğerleri, 1995).

Tam atenüasyon, kültüre edilen şizontların hayvanlarda parazitemi, klinik ve parazitolojik belirtilerinin görülmemesi ile şekillenmektedir (Pipano, 1977). Yetersiz atenüasyon sonucunda aşının etkinliği ve güvenilirliği ile ilgili sorunlar oluşmaktadır. Atenüasyon düzeyini belirlemek için klinik, parazitolojik ve biyokimyasal değişimlerin görülmesinden daha kolay sonuç alınabilir bir yöntem olarak *T. annulata* ’ya özgü atenüasyon markerları ile atenüasyon düzeyini tespit edilmesi ön plana çıkmaktadır. Atenüasyon, gen ekspresyon seviyelerinde değişim ve avirülent parazit alt populasyonların seçimi gibi birden çok etmeni içerisinde barındıran bir işlemdir (Hall ve diğerleri, 1999), ancak atenüasyondaki moleküler etkileşmeler tam olarak belirlenememiştir. Atenüasyon düzeyini belirlemek için alternatif bir yöntem olarak atenüasyon markerları ile atenüasyon düzeyini tespit edilmesi ön plana çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında, *T. annulata* ile enfekte hücre kültüründe düşük, orta ve yüksek pasajlı suşlar ile aşı olarak kullanılan izolatlarda, spesifik atenüasyon markerı olarak kullanılabilecek histone deactylases (HDACs) (Grützbach ve diğerleri, 2016), ısı şok protein 90 (HSP90) (Mohammed ve diğerleri, 2016), MMP9 (Sommerville ve diğerleri ,1998), c-Jun (Echebli ve diğerleri, 2014) ile CD69, ICAM-1, CD49 ve ITGB5 gibi AP-1 hedef gen bölgelerinde meydana gelen ekspresyon seviyelerindeki farklılaşmalara bakılarak atenüasyon düzeylerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek veriler doğrultusunda aşılamada kullanılacak olan canlı, atenüye hücre hatlarındaki atenüyasyon düzeylerinin etkin olarak tespit edilmesi ve aşılamada kullanılacak olan hücre hatları ile yapılması gerekli olan deneysel enfeksiyon basamaklarını atlanarak zaman ve maliyet tasarrufu sağlayacak olması açısından önemlidir.

**3. GEREÇ ve YÖNTEM**

**3.1. Gereç**

**3.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali**

Bu çalışmada parazit materyali olarak *T. annulata* ’nın Acarlar ve Cincin izolatlarına ait düşük, orta ve yüksek pasajları, *T. annulata* Ankara/Pendik izolatının düşük, orta ve yüksek pasajları ile aşı olarak kullanılan TeylovacTM (Vetal, Türkiye) ticari suşu kullanılmıştır (Tablo 1). İlgili suşlar daha önceki yıllarda yapılmış olan saha çalışmaları esnasında tropikal theileriosisli hayvanlardan izole edilerek laboratuvarda *in vitro* ortamda üretilip pasajlanmıştır.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan *T. annulata* hücre kültürü hatları ve pasaj sayıları

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Hücre hatları** | **Pasaj Sayısı** | | |
| **Düşük** | **Orta** | **Yüksek** |
| Teylovac\* | — | — | >300 |
| Ta Acarlar | Pasaj 10 | Pasaj 116 | Pasaj 209 |
| Ta Cincin | Pasaj 10 | Pasaj 148 | Pasaj 229 ve  Pasaj 252 |
| Ta Ankara | Pasaj 15 | — | — |
| TaAnkara/ Pendik | Pasaj 66 | — | Pasaj 327 |

(\*); aşı olarak kullanılan TeylovacTM (Vetal, Türkiye) ticari suşunu ifade etmektedir.

**3.2. Yöntem**

**3.2.1. Atenüasyon Seviyesinin Belirlenmesi**

Belirtilen hücre hatları (Tablo 1) ile aşı olarak kullanılan TeylovacTM (Vetal, Türkiye) ticari suşundaki atenüasyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla HADC, HSP90, ICAM-1, CD49, ITGB5, TIMP-3, ADAM-19, MMP9 ve HRPT-1 hedef gen bölgeler bölgelerinin ekspresyon seviyelerindeki farklılaşmalar incelenmiştir. HADC, HSP90, ICAM-1, CD49, ITGB5, TIMP-3, ADAM-19, MMP9 ve HRPT-1 hedef gen bölgelerinde meydana gelen ekspresyon seviyelerindeki farklılaşmaları tespit edilmesinde kullanılacak *T. annulata*’ya özgü atenüasyon markerleri Tablo 2’de verilmiştir. ICAM-1, CD49, ITGB5, TIMP-3, ADAM-19, MMP9, HRPT-1 gen bölgelerinde meydana gelen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde daha önceki çalışmalarda belirtilen markerler (Sommerville ve diğerleri,.1998; Echebli ve diğerleri, 2014) kullanılırken, HADC ve HSP90 gen bölgelerinde meydana gelen ekspresyon seviyelerinin tespiti amacıyla bu tez çalışmasında tasarlanan primerler kullanılmıştır (Tablo 2). Bu amaçla, *T. annulata* genomunda (<https://piroplasmadb.org/>) yer alan ve histone deacetylase (HDAC) eksprese eden TA12690, TA17590 ve TA18230 gen bölgeleri seçilerek bu gen bölgelerine ait sırasıyla 230, 208 ve 156 bp uzunluklara sahip bölgelere özgü primerler tasarlanmıştır (Tablo 2). Bunun yanında, *T. annulata* genomunda (<https://piroplasmadb.org/>) yer alan ısı şok proteini (HSP90) eksprese eden TA10720 gen bölgesine özgü 181 ve 198 bp uzunluklarında iki bölgeye ve TA06470 gen bölgesi üzerinde yer alan 181 ve 121 bp uzunluklarındaki iki bölgeye özgü ikişer primer tasarlanmıştır (Tablo 2). Belirtilen gen bölgelerinde düşük, orta ve yüksek pasajlı suşlar ile aşı olarak kullanılan izolatlardaki ekspresyon seviyelerindeki farklılaşmaların belirlenmesi için iki basamaklı bir protokol kullanılmıştır. Birinci basamakta, enfekte hücre kültürlerinden cDNA örnekleri elde edilmiş ve ikinci basamakta bu cDNA’lar kullanılarak yapılan PZR’ler ile her bir gen bölgesinin ekspresyon seviyelerinin tespiti yapılmıştır.

**Tablo 2.** Atenüasyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan markerler

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Hedef gen bölgeleri** | **Ekpresyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizilimleria** | ***T. annulata* genomunda çoğaltılan ürün boyutu (bp)** | **Kaynak** |
| **Histone deactylases (HDACs)** | | | |
| TA12690 | For; CTCAGAGAATTAGAATGGCCCACGC  Rev; CGTATAAACCGTCGAAAACTGGGC | 230 | Bu tez |
| TA17590 | For; AGGTGATTATCAGCAATGACAACGG  Rev; GTATCTCCATCAGCTAAAACAGGCC | 208 |
| TA18230 | For; ACATGGACCAATATCACGTAGAATCCC  Rev; TAAGAATCTGCCTGAAAACCGGCCG | 156 |
| **Heat shock protein 90 (HSP90)** | | | |
| TA10720F1 | For; ATAGATGGAAGTCAGATAGTAACGG  Rev; CGGATGAATTCTGAATACTTTCTCA | 181 | Bu tez |
| TA10720F2 | For; TGAGAAAGTATTCAGAATTCATCCG  Rev; GCTTTATTGTTGCTTGATCTCTTCTCC | 198 |
| TA06470F1 | For; CTCCTGGACATTATCGTAAACTCAC  Rev; GCAGTCTCTTCTTCGGGTATGACCGG | 181 |
| TA06470F2 | For; TACCTCTTCTCAATATACGGTGTGG  Rev; AAACTGTTCTCACCACCTTTTTCCC | 121 |
| **MMP9 ve C-jun** | | | |
| ICAM-1 | For; GCAACTTCTCCTGCTCTGCT  Rev; CTCCAGGGTCTGGGTTTTGT | 964 | Echebli ve diğerleri, 2014 |
| CD49 | For; AGCCCCTCAACATGAACAGA  Rev; TCCCACGAGTAGGTCTGAGA | 166 |
| ITGB5 | For; TGGAACTTGGCGAACTCTCT  Rev; GGGTTTGCACTTCTGGTCAT | 71 |
| CD69 | For; AATGGTCAAATGGCCAAGAA  Rev; TCTCAGACCCCGTAAGGTTG | 54 |
| TIMP3 | For; ACAGGCCGAGTCTATGATGG  Rev; ACAGCCCAGGTGATATCGATAGTT | 117 |
| ADAM19 | For; GGAAGGACATGAATGGGAAA  Rev; CTCGGAACTCTGACACTGGA | 80 |
| MMP9 | For; CCCATTAGCACGCACGACAT  Rev; TCACGTAGCCCACATAGTCCA | 300 | Sommerville ve diğerleri, 1998 |
| HPRT-1 | For; TGGACAGGACCGAACGGCT  Rev; TAATCCAACAGGTCGGCAAAG | 115 | Echebli ve diğerleri, 2014 |

(a); primerler dizilimleri 5'→3' yönünde verilmiştir.

**3.2.1.1. *Theileria annulata* İzolatlarından cDNA Elde Edilmesi**

Atenüasyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılacak olan, *T. annulata*’nın Acarlar, Cincin, Ankara ve Pendik izolatlarına ait düşük, orta ve yüksek pasajlar ile aşı olarak kullanılan TeylovacTM (Vetal, Türkiye) ticari suşu *in vitro* olarak hücre kültüründe çoğaltılamıştır. Bu amaçla, ilk olarak azot tankında %10 DMSO ile dondurulmuş halde bulunan hücreleri içeren viyaller 37°C’lik su banyosunda çözündükten sonra alt üst edilerek içerisinde medyum RPMI-1640 (GIBCO, US) + %20 yeni doğmuş buzağı serumu (New Born Calf Serum; NCS, Gibco, UK) + L-glutamin + 10U/ml Penisilin/streptomisin (Gibso, UK)] bulunan tüplere eklenerek 1500 devirde +4°C’de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda içersinde DMSO bulunan süpernatant uzaklaştırılmış ve dipte hücrelerin biriktiği beyaz tortu aynı medyumla süspanse edilerek 25 cm2 flasklara aktarılmıştır. Çözdürülen hücrelerin üreme fazına girebilmeleri için bu flasklar %5 CO2’li etüvde, 37°C’de inkübe edilmiştir. Hücre kültürleri düzenli aralıklarla invert mikroskop altında hücrelerin üremesi, morfolojik yapısı bakımından incelenmiş ve 2-3 günde bir sağlıklı üreme gösteren hücrelerde bulunan medyum yenilenmiştir. 25 ml’lik flasklar içinde sağlıklı hücre üremesine sahip hücre kültürlerinin thoma lamında sayımı yapılmış ve ml’sinde 2x107 hücre bulunan kültürler 15 ml’lik steril tüplere aktarılarak santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi 1500 devirde +4°C’de 10 dakika olarak ayarlanmış, böylece hücrelerin, tüpün dip kısmında toplanması sağlanmıştır. Çökeltinin süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılıp dipte kalan hücre peleti üzerine 10 ml fosfat tampon solüsyonu (1 x PBS; 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na2HPO4, 2.4 g KH2PO4 450 ml distile su içerisinde, pH 7.4) eklenip alt-üst edildikten sonra yukarıdaki şekilde santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmış ve hücrelerin yıkınması sağlanmıştır.

Daha sonra ml’sinde 2x107 hücre bulunan her bir hücre kültüründen Pure Link RNA Mini Kit (İnvitrogen, Thermofisher, ABD) kullanılarak izole edilmiştir. Bu amaçla, içerisinde 2 x 107 bulunan ependorf içindeki hücre peletindeki RNA'nın, DNA'dan ve proteinden ayrılması için üzerine 1,5 ml Trizol eklenerek pelet çözdürülüp beş dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Her 1,5 ml Trizol için 0,3 ml Kloroform eklenmiş, el ile iyice çalkalanmış ve oda ısısında üç dakika inkübe edilmiş ve akabinde 12000 devirde 15 dakika +4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üste kalan ve içerisinde RNA ihtiva eden sulu (renksiz) faz, DNA’nın bulunduğu ara faz ve organik faz proteinleri ihtiva eden alt kısımdan diğer fazlara dokunmadan yeni bir ependorfa aktarıldıktan sonra aynı miktarda %70 Etanol eklenerek vortekslenmiştir. Etanol ile muamele edilen süspansiyon kitin içinde bulunan kolon tüpe aktarılmıştır. Daha sonra, RNA’daki muhtemel DNA kontaminasyonlarını minimize etmek için hücreler hücreler DNase ile muamele edilmiş ve akabinde DNase eliminasyonu için ‘On Column Purelink DNase Tedavisi Protokolü’ne geçilmiştir. Filtreli ependorf, kit içinde bulunan yeni bir column tüpe aktarılmış, daha sonra 350 µl yıkama tampon solüsyonu 1 (WB-I) eklenerek 12000 devirde 15 saniye santrifüj edilmiştir. Her bir örnek üzerine 80 µl eklenecek şekilde PureLink Dnase çözeltisi her örnek üzerine eklendikten sonra 15 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra 350 µl WB-I eklenerek 12000 devirde 15 saniye boyunca +4°C’de santrifüj edilmiştir. Ardından 500 µl WB-II eklenerek aynı şekilde santrifüj edilmiştir. Filtreli ependorf, yeni bir ependorfa aktarılıp üzerine 60 µl RNase’dan ari su eklenerek oda ısısında bir dakika inkübe edilmiştir. Ardından 12000 devirde 1 dk boyunca santirüj edilip RNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Ancak DNase kontaminasyonunu daha iyi elimine edebilmek için ikinci bir DNase Treatment işlemi Mercaptoetanol kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, RNA solüsyonlarından her bir örnek için 50 µl alınarak yeni bir ependorfa aktarılmış üzerlerine 100 µl RNase’dan ari su ve 150 µl etanol eklenmiştir. Daha sonra %1 Merkaptoetanol içeren 150 µl lizis tampon çözeltisi hazırlanmış ve örnek miltarı kadar çoğaltılarak RNA örnekleri üzerine eklenmiş olup beş defa pipete edilerek Spin Column (filtreli ependorf)’a aktarılmış ve 12000 devirde 15 saniye santrifüj edilmiştir. Dipteki sıvı tekrar filtreye ekleyip 12000 devirde 15 saniye santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Filtreli ependorf yeni bir column ependorfa aktarılıp 350 µl WB-I yıkama solüsyonu eklenerek, DNase tedavi protokolü aynı şekilde uygulanmıştır. Elde edilen RNA DEPC’li su ile hazırlanan 10mM Tris-HCL ile 1:20 oranında dilüye edilerek spektrofotometre cihazında (Multiskan Go, Thermo Scientific, ABD) ölçüm yapılmıştır. Elde edilen ölçüm değerleri Tablo 3’te verilmiştir. Daha sonra RNA’dan cDNA izolasyon işlemi yapılana kadar -80°C’de saklanarak sonraki çalışmalarda hazır hale gelmiştir.

RNA örnekleri izole elde edildikten sonra RNA’dan komplementer DNA (cDNA) sentezine geçilmiş ve cDNA izolasyonu, Applied Biosystems™ High Capacity RNA to cDNA™, cDNA Reverse Transcription PCR Kit (Thermo Fisher, Litvanya) protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Kit protokolünde belirtildiği gibi 20 µL son hacimdeki reaksiyonda 2 µg'a kadar RNA'nın tek iplikli cDNA'ya kantitatif dönüşümünü gerçekleştirebilmektedir. Komplementer DNA (cDNA) sentezine esnasında tüm işlemler buz üzerinde yapılmıştır. Her bir örnek 10 µl hacimde 2 µg RNA içerecek şekilde Nüklease’dan ari su (NFW) ile dilüe edilmiş ve santrifüj cihazında kısa bir santrifüje tabi tutulmuştur. Akabinde cDNA sentezi için gerçekleştirilecek olan PZR reaksiyonu 20 µl son hacimde; 10 µl RNA örneği üzerine 10 µl 2x RT Master Mix solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır. 2x RT Master Mix (bir örnek için) ayrı bir ependorfa; 10 RT Buffer 2 µl, dNTP 0,8 µl, 10x Random Primer 2 µl, MultiScribe™ Reverse Transcriptase µl, Nuclease Free Water 4,2 µl eklenerek hazırlanmıştır. Dilüe edilmiş RNA ve hazırlanan karışım ayrı bir ependorfta bir araya getirilmiştir. RNA örneklerindeki muhtemel DNA kontaminasyonunu belirlemek için her örneğe No-RT PZR uygulanmıştır. No-RT PZR Mix için; 20 µl son hacimde; 10 µl hacimde 2 µg RNA içerecek şekilde NFW ile dilüye edilmiş RNA, 10X RT Buffer 2 µl, dNTP 0,8 µl, 10x Random Primer 2 µl, NFW 5,2 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PZR reaksiyonları thermal siklus cihazında; 25°C 10 dk, 37°C 120 dk, 85°C 5 dk olarak uygulanmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri, ikinci basamak olan her bir gen bölgesinin ekspresyon seviyelerinin tespiti için PZR’unda kullanılıncaya kadar -80ºC’de muhafaza edilmiştir.

**Tablo 3.** Elde edilenRNA örneklerinin birinci ve ikinci DNase ile muamele sonrasındaki RNA miktarları ve final konsantrasyonları

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Örnekler** | **Birinci DNase Tedavisi Sonrası (µg/ml)** | **Final Konsantrasyon (µg/ml)** | **İkinci DNase Tedavisi Sonrası (µg/ml)** | **Final Konsantasyon (µg/ml)** |
|  |
| Teylovac | 42,1 | 842 | 18,9 | 378 |
| Ta Acarlar P9 | 66,4 | 1328 | 40,7 | 814 |
| Ta Acarlar P116 | 36,5 | 730 | 22,6 | 452 |
| Ta Acarlar P209 | 73,3 | 1466 | 49,4 | 988 |
| Ta Cincin P9 | 121 | 2420 | 82,9 | 1658 |
| Ta Cincin P148 | 41,1 | 822 | 27,4 | 548 |
| Ta Cincin P229 | 58,9 | 1178 | 41,9 | 838 |
| Ta Cincin P252 | 90,9 | 1818 | 80,8 | 1616 |
| Ta Ankara P15 | 32,9 | 658 | 22,2 | 444 |
| Ta Ankara / Pendik P66 | 31,8 | 636 | 22 | 440 |
| Ta Pendik P327 | 59,5 | 1190 | 35,2 | 704 |

**3.2.1.2. Belirlenen Gen Bölgelerinin Her Bir *T. annulata* İzolatının Farklı Pasajlarındaki Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi**

Atenüasyon markeri olarak kullanılacak gen bölgelerinin farklı pasajlardaki *T. annulata* izolatlarına ait hücre kültürlerindeki ekspresyon seviyelerindeki değişimler ilgili pasajlardan hazırlanan cDNA örnekleri kullanılarak yapılan PZR’ler ile belirlenmiştir. İlgili gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerindeki farklılaşmaların tespitinde kullanılacak olan primer çiftlerine ait bilgiler Tablo 2’de verilmiştir. Bu amaçla uygulanacak olan PZR’ler 50 μl’lik son haciminde; 45 mM Tris– HCl, pH 8.8, 11 mM (NH4)2SO4, 4.5 mM MgCl2, 0.113 mg/ml BSA, 4.4 μM EDTA, herbir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP.’ tan 1 mM, 1 U VitaTaq HS DNA polimeraz (Applied Biosystems.ABD), 10 μM ileri ve geri yönlü adaptörlü primer çifti ile 1 μl cDNA örneği kullanılmıştır. PCR reaksiyonu Veriti (Applied Biosystems) marka otomatik termal sikluslu makine kullanılarak 94°C’de 5 dk ön denaturasyonu takiben, her siklus denaturasyon (94°C’de 50 sn), bağlanma (50°C’de 50 sn) ve uzama (72°C’de 50 sn; uzama süreleri her gen bölgesi ve/veya gen bölgesine ait fragmentlerin uzunlukları göz önünde tutularak belirlenmiştir) aşamalarından oluşan 30 siklus ve 72°C’de 10 dk’lık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çoğaltılan PCR ürününden 25 μl alınarak 2 μl DNA yükleme solüsyonu ile karıştırılarak, mililitresinde 10 µl/ml Safe View (Applied Biological Materials, ABD) olan Tris-asetat-EDTA (TAE) tampon solüsyonu içeren %1,5 agaroz jelde 1 saat boyunca 100 Volt'da elektroforeze tabi tutulmuştur. Çoğaltılan ürünlerin uzunluklarını belirlemek amacıyla 100 bp DNA marker (ABM 100bp/1kb Opti-DNA Marker, Canada) kullanılmıştır. Ardından ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar UVP görüntüleme (EC3 Imaging System, ABD) ve analiz programı ([VisionWorks LS Analysis Software) kullanılarak belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi görüntüsü belirtilen cihaz ve programda elde edildikten sonra ilgili gen bölgesinde çoğalma gösteren izolatlar arasındaki dansite farkına bakılmıştır. Bunun için; analiz programının dansite alanı bulma seçeneğinden öncelikle marker seçilmiş ve markerdaki ışıma öncü kabul edilerek 100 puan olarak alınmıştır. Daha sonra çoğalma gösteren izolatların çoğaldığı baz çifti (bp)’lar seçilmiştir. Her bir örneğe bir kod verilmiş ve ardından programın örneklerin çoğaldığı alanlardaki ışımalar bize ekspresyon seviyeleri arasındaki farkı vermiştir.](https://www.labortechnik.com/en/vision-works-ls/analysis-software)

**3.2.2. Dizilim Analizleri**

Komplementer DNA ile ilgili gen bölgelerine özgü markerler kullanılarak yapılan PZR’ler sonucunda istenilen gen bölesinin özgün olarak çoğaltılıp çoğaltılmadığının kontrol edilmesi amacıyla PZR ürünlerinin dizilim analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, çoğaltılan bölgelere ait PZR ürünleri ayrı ayrı %1,5’lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş ve takibinde her bir gen bölgesinin ilgili uzunluklardaki PZR ürünleri jelden kesilerek ayrılmış ve İnvitrogen Purelink Gel Purifikasyon Kiti (İnvitrogen, Thermofisher, ABD) kullanılarak üretici firma tarafından verilen protokole uygun şekilde purifiye edilmişlerdir. Pürifiye edilen PZR ürünlerinin klonlanmasında TOPO TA Klonlama Kiti (Invitrogen, Thermofisher, ABD) kullanılmış ve kit protokolüne uygun şekilde klonlanmıştır. Protokolde belirtildiği gibi bir ependorfun içine 4 µl PCR ürünü + 1 µl Tuz solution + 1 µl pCR™4-TOPO™ vektörü eklenmiş, el ile bir iki kez karışması sağlanmıştır. Ardından klonlama reaksiyonun gerçekleşeceği ependorf 23°C’de termal blokta (Techne, ABD) 5ila 10 dakika arasında (klonlanacak olan bölgenin boyutuna göre süre uzatılmıştır) inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon sırasında -80°C muhafaza edilen One Shot™ kimyasal olarak komponent *Escherichia coli* (İnvitrogen, Thermofisher, ABD) hücreleri buz üzerine alınarak erimesi sağlanmıştır. İnkubasyon süresi sonunda klonlanma işlemi tamamlanmış pCR™4-TOPO™ vektöründen 2 µl alınarak *E. coli* hücrelerinın üzerine eklenmiş ardından buz üzerinde 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücreler dikkatlice 42°C’deki su banyosunda (Memmert, Germany) 30 saniye ısı şokuna tabii tutulmuştur. Ardından vakit kaybetmeden hücreler buz üzerine alınmış ve üzerine 250 µl S.O.C medyum eklenmiştir. Hücreler yatay inkübatörde çalkalanarak 200 rpm’de 37°C’de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonunda S.O.C medyum içeren hücreler içerisinde 50 μg/ml ampicilin bulunan LB agara ekilerek bir gece boyunca 37°C’de etüvde (Memmert, Germany) hücre kolonilerinin üremesi için inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün LB agarda üreme gösteren kolonilerden birer koloni seçilerek 100 μg/ml Ampicilin içeren LB medyum içine koloniler eklenmiş ve 37°C’de çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific, Canada) 200 rpm’de bir gece üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün kolonilerdeki üreme kontrol edilmiş, üreme gösteren kolonilerden önce gliserol stokları 1-1 oranında (500 µl üreyen hücre + 500 µl %50 gliserol) hazırlanmış -80ºC’de daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır. Geriye kalan hücreler PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kiti (Invitrogen, Thermofisher, ABD) kullanılarak plasmid DNA’lar üretici firmanın protokolüne uygun olarak pürifiye edilmiştir. Pürifiye işlemi sonrası elde edilen plazmid DNA miktarları spektrofotometrik (Multiskan Go, Thermo Scientific, ABD) ölçüm sonrasında EcoRI restriksiyon enzimi (Invitrogen Thermo Scientific, ABD) ile kesilerek ilgili gen bölgesinin plazmid DNA içerisinde pürifiye edilip edilmediğini belirlemek amacıyla 20µL son hacimde; 10X buffer, 1 μg pürifiye plazmid DNA’sı ve 1 U EcoRI restriksiyon enzimi bir ependorf içinde alınmış 37°C’de 15 dakika ardından 80°C’ de 5 dakika’lık iki inkübasyon ile plasmid vektör içeren bölgenin kesilmesi sağlanmıştır. Kesilen ürünler, %1,5 agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat boyunca elektroforeze tabi tutulmuş ve UV ışık içeren görüntüleme cihazında (EC3 Imaging System, ABD) kesilen ürünlerin uzunluklarına bakılarak, ilgili gen bölgesinin vektör içerisine klonlanlanıp klonlanmadığı doğrulanmıştır. Pürifiye edilen ve içerisinde klonlanmış gen bölgelerini ihtiva eden saflaştırılmış plasmid DNA örnekleri nükleotid dizilim analizlerinin yapılması amacıyla ticari şirkete (Eurofins Genomics, Almanya) gönderilmiştir.

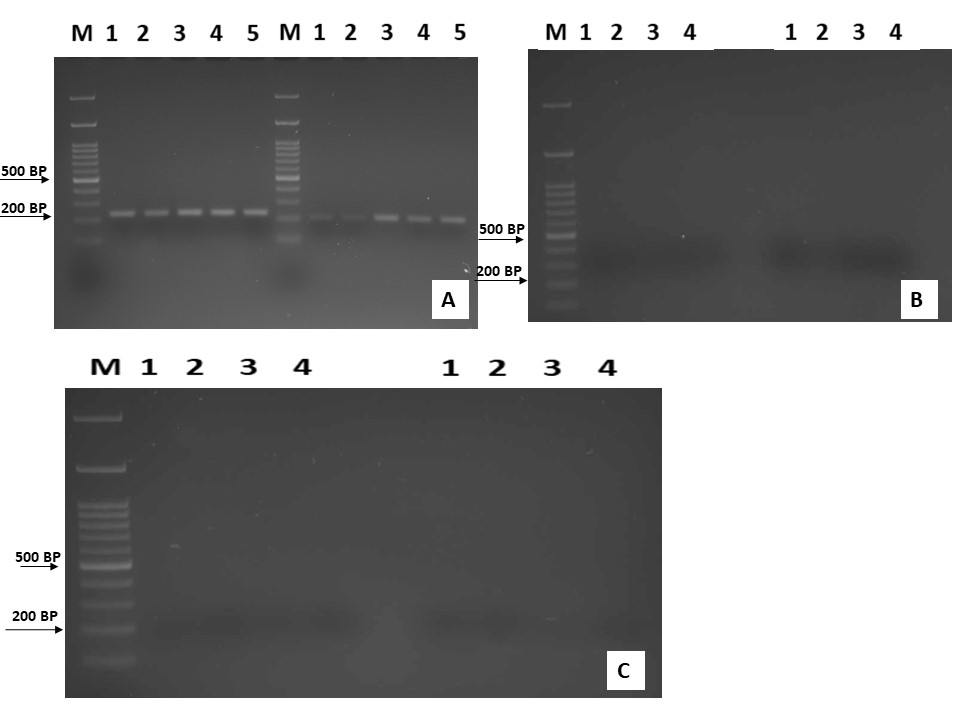
**3.2.3. Veri Analizleri**

*Theileria annulata* ile enfekte hücre kültüründe düşük, orta ve yüksek pasajlı suşlar ile aşı olarak kullanılan izolatlardaki histone deactylases (HDACs), HSP90, MMP9 ile AP-1 hedef gen bölgelerinde meydana gelen ekspresyon seviyelerindeki farklılaşmalar SPSS (22.00, software) programı ile ki – kare testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. P değeri 0,05'ten düşük olduğunda, gözlemlenen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

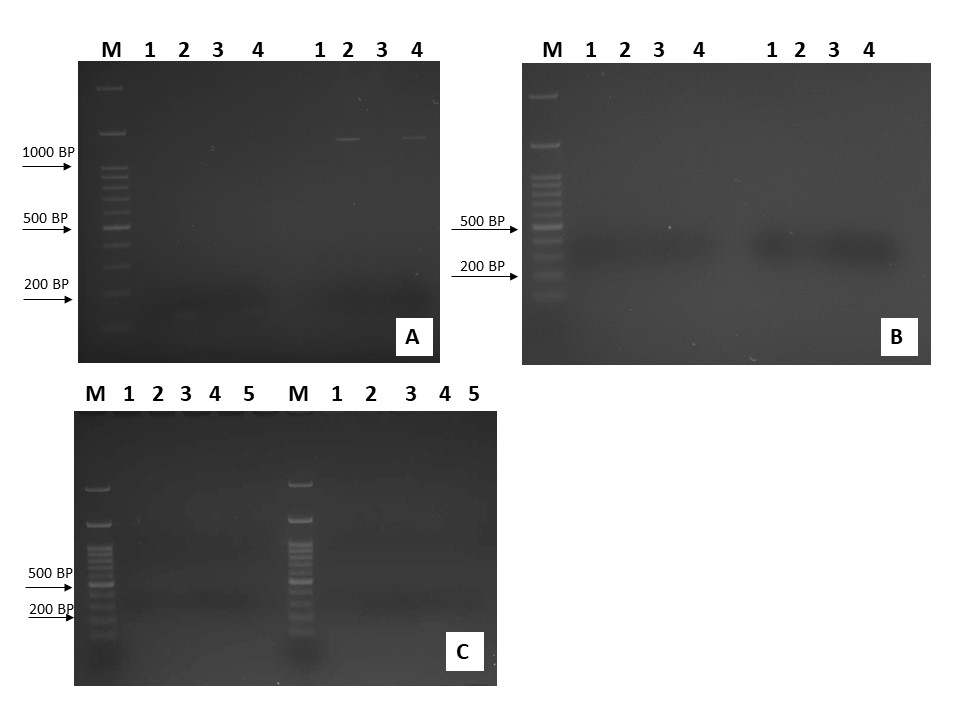
**4. BULGULAR**

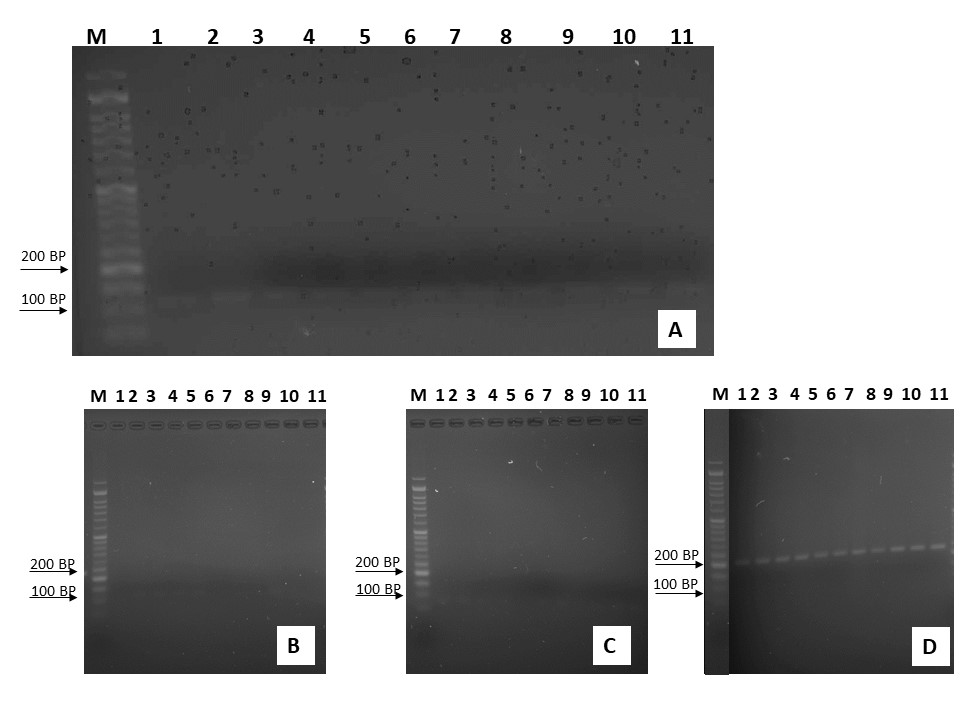
**4.1. Belirlenen Gen Bölgelerinin Farklı Pasajlarındaki Ekspresyon Seviyeleri**

Bu çalışmada kullanılan toplam 11 *T. annulata* hücre kültüründeki ilgili gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan cDNA’ların elde edilmesi için izole edilen RNA’ların spektrofotometre cihazında yapılan ölçüm sonuçları Tablo 3’de verilmiştir. Daha sonra elde edilen RNA’lardan cDNA’lar sentez edilmiş ve ilgili izolatların atenüasyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılması planlanan gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak ön denemler yapılmıştır. Yapılan ön denemelerde D7 (Ankara), hayvan deneyi öncesi alınan day 7, *T. annulata* / Tunus izolatı ve Türkiye’den *T. annulat*a / Germencik ve *T. annulata* / Cincin olmak üzere beş farklı izolat kullanılarak ilgili gen bölgeriyle PZR yapılmıştır. PZR, 2.2.2. bölümde belirtilen kondüsyonlarla yapılmıştır (Resim 3-4). HDAC gen bölgesiyle yapılan PZR’da D7 (Ankara) örneği tükendiği için diğer PZR’larda kullanılamamıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda kullanılan tüm izolatlarda çalıştığı bilinen atenüasyon markerları (HRPT-1, TIMP-3, HDAC, ADAM-19) kullanılarak atenüasyon seviyeleri elde edilen cDNA’lar kullanılarak PZR’u gerçekleştirilmiştir (Resim 5).



**Resim 3.** HDAC, ICAM-1, MMP9 ve HRPT-1 gen bölgelerine özgü markerler kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü. (**A**);HDAC [Ta12690 (sol)-Ta17590 (sağ)]; M, 100 bp’lik moleküler uzunluk belirleyici (Gendirex), 1. D7 (Ankara), 2. Hayvan deneyi öncesi day 7, 3. *Theileria annulata* Tunus izolatı, 4. *T. annulata* Germencik, 5. *T. annulata* Cincin. (**B**); ICAM-1(sol) ve CD49(sağ); M, 100 bp’lik moleküler uzunluk belirleyici (Gendirex), 1. Hayvan deneyi öncesi day 7, 2. Tunus izolatı, 3. *T. annulata* Germencik, 4. *T. annulata* Cincin. (**C**); MMMP9 (sol) ve HRPT-1 (sağ); M, 100 bp’lik moleküler uzunluk belirleyici (Gendirex), 1. Hayvan deneyi öncesi, 2. Tunus izolatı, 3. *T. annulata* Germencik, 4. *T. annulata* Cincin.

**Resim 4.** TIMP-3, ADAM-19, ITGB-5, CD69, HSP90 gen bölgelerine özgü markerler kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü. (**A**); TIMP-3 (sol) ve ADAM-19 (sağ); M, 100 bp’lik moleküler uzunluk belirleyici (Gendirex), 1. D7 (Ankara), 2. Hayvan deneyi öncesi day 7, 3. Tunus izolatı, 4. *T. annulata* Germencik, 5. *T. annulata* Cincin. (**B**); ITGB-5 (sol) ve CD69 (sağ); M, 100 bp’lik moleküler uzunluk belirleyici (Gendirex), 1. Hayvan deneyi öncesi day 7, 2.*Theileria annulata* Tunus, 3. *T. annulata* Germencik, 4. *T. annulata* Cincin. (**C**); HSP90 [Ta10720 (sol) ve HSP90 Ta06470 (sağ)]; M, 100 bp’lik moleküler uzunluk belirleyici (Gendirex), 1. Hayvan deneyi öncesi, 2. Tunus izolatı, 3. *T. annulata* Germencik, 4. *T. annulata* Cincin.

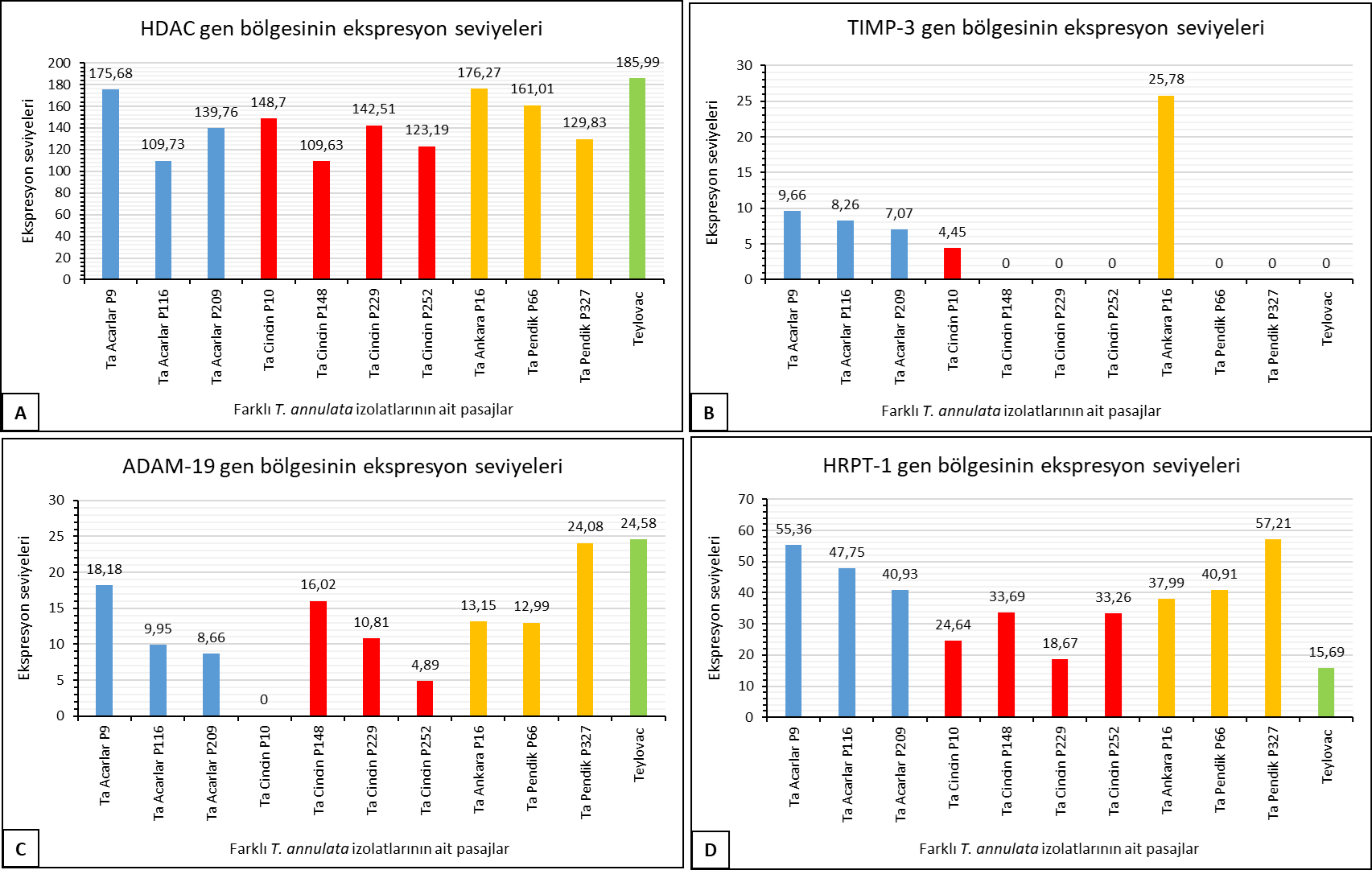
**Resim 5.**  HRPT-1 (**A**), TIMP-3 (**B**), ADAM-19 (**C**), HDAC (**D**) markerleri kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü. (**A**); 1. *T. annulata* aşı suşu Teylovac, 2. *T. annulata* Acarlar pasaj 9, 3. *T. annulata* Acarlar pasaj 116, 4. *T. annulata* Acarlar pasaj 209, 5. *T. annulata* Cincin pasaj 10, 6. *T. annulata* Cincin pasaj 148, 7. *T. annulata* Cincin pasaj 229, 8. *T. annulata* Cincin pasaj 252, 9. *T. annulata* Ankara pasaj 16, 10. *T. annulata* Pendik pasaj 66, 11. *T. annulata* Pendik pasaj 327. (**B**); 1. *T. annulata* aşı suşu Teylovac, 2. *T. annulata* Acarlar pasaj 9, 3. *T. annulata* Acarlar psaj 116, 4. *T. annulata* Acarlar pasaj 209, 5. *T. annulata* Cincin pasaj 10, 6. *T. annulata* Cincin pasaj 148, 7. *T. annulata* Cincin pasaj 229, 8. *T. annulata* Cincin pasaj 252, 9. *T. annulata* Ankara pasaj 16, 10. *T. annulata* Pendik pasaj 66, 11. *T. annulata* Pendik pasaj 327. (**C**); 1. *T. annulata* aşı suşu Teylovac, 2. *T. annulata* Acarlar pasaj 9, 3. *T. annulata* Acarlar psaj 116, 4. *T. annulata* Acarlar pasaj 209, 5. *T. annulata* Cincin pasaj 10, 6. *T. annulata* Cincin pasaj 148, 7. *T. annulata* Cincin pasaj 229, 8. *T. annulata* Cincin pasaj 252, 9. *T. annulata* Ankara pasaj 16, 10. *T. annulata* Pendik pasaj 66, 11. *T. annulata* Pendik pasaj 327. (**D**); 1. *T. annulata* aşı suşu Teylovac, 2. *T. annulata* Acarlar pasaj 9, 3. *T. annulata* Acarlar psaj 116, 4. *T. annulata* Acarlar pasaj 209, 5. *T. annulata* Cincin pasaj 10, 6. *T. annulata* Cincin pasaj 148, 7. *T. annulata* Cincin pasaj 229, 8. *T. annulata* Cincin pasaj 252, 9. *T. annulata* Ankara pasaj 16, 10. *T. annulata* Pendik pasaj 66, 11. *T. annulata* Pendik pasaj 327. M; 100 bp’lik moleküler uzunluk belirleyici (Abm).

HADC, TIMP-3, ADAM-19 ve HRPT-1 gen bölgesine ait ekspresyon seviyeleri, her gen bölgesine ait PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezleri sonrasında elde edilen görüntüler UVP görüntüleme cihazında yer alan [VisionWorks LS Analysis Software kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçların histogram görüntüleri](https://www.labortechnik.com/en/vision-works-ls/analysis-software) Şekil 5 (A-D)’de gösterilmiştir. Histon deasetiaz (HDAC) gen bölgesinin *T. annulata*Acarlar izolatına ait dokuzuncu pasaja kıyasla 166. pasajında belirgin bir düşüş gözlenmekle birlikte gibi daha yüksek pasajlarda (pasaj 209) ise ekspresyon seviyesinde tekrar bir miktar artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5A). *T. annulata* Cincin izolatına ait farklı pasajlarda ise dalgalı bir ekspresyon seviyesi gösteren HDAC geni pasaj 10’a kıyasla pasaj 148 ve pasaj 252’de belirgin bir azalma gösterirken, ara bir pasaj olan pasaj 229’da ise göreceli bir artış göstermiş, ancak bu artış ilk pasajlardaki (pasaj 10) seviyesine ulaşmamıştır. *T. annulata* Ankara pasaj 16, *T. annulata* Ankara/Pendik pasajlar 66 ve 327 arasında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bunun yanında, diğer izolatlarda pasaj sayısı ile ekspresyon seviyesi arasında anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir. Bunun yanında, genin en yüksek ekspresyon değeri aşı suşu olarak kullanılan TeylovacTM’ da belirlenmiştir (Şekil 5A). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda izolatlar ve izolatlara ait farklı pasajlardaki ekspresyon seviyeleri arasında ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

TIMP-3 gen bölgesiyle yapılan PZR’da ilgili gen bölgesi yalnızca *T. annulata*Acarlar ‘ın tüm pasajları (pasaj9, 116 ve 209), *T. annulata*Cincin pasaj 10 ve *T. annulata*/Ankara pasaj 16 izolatlarında ekspere edilmiştir (Şekil 5B). *T. annulata*Acarlar izolatının pasaj 9, pasaj 116 ve 209. pasajlarında, pasaj sayısı arttıkça ekspresyon seviyeside azalmıştır. Bunun yanında, TIMP-3 gen bölgesinin *T. annulata*/Cincin’e ait pasaj 10’da *T. annulata*Ankara izolatına ait pasaj 16’ya kıyasla 5.7 kat daha az eksprese edildiği gözlenmiştir (Şekil 5B). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda izolatlar ve izolatlara ait farklı pasajlardaki TIMP-3 geninin ekspresyon seviyeleri arasında ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

ADAM-19 genin, *T. annulata*Cincin’in düşük pasajı olan pasaj 10 hariç diğer tüm izolatlarda eksprese edildiği görülmüştür (Şekil 5 C). *T. annulata*Acarlar (pasaj 9, 116 ve 209) ve *T. annulata*Cincin (pasaj 148, 229 ve 252) izolatlarına ait farklı pasajlar incelendiğinde pasaj sayısı arttıkçta ilgili gen bölgesinin ekspresyon seviyesinde bir azalma tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *T. annulata*Ankara pasaj 16 ve *T. annulata* Ankara/Pendik pasaj 66 izolatları arasında belirgin bir ekspresyon farkı gözlenmemiştir. Ayrıca *T. annulata* Ankara/Pendik izolatının 327. pasajında ekspresyon seviyesinde çok belirgin bir artış gözlenmiş ve bu artış ticari aşı preparatı olan Teylovac ile çok yakın düzeyde seyretmiştir (Şekil 5 C). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda izolatlar ve izolatlara ait farklı pasajlardaki ekspresyon seviyeleri arasında ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

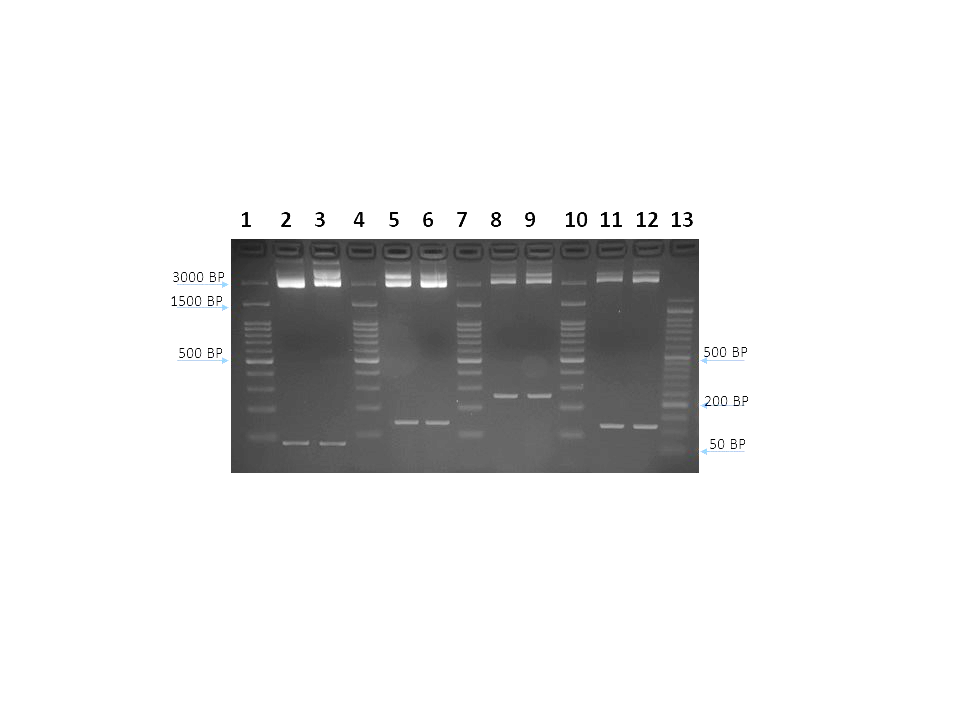
HPRT-1 geni ile yapılan PZR sonucunda; ilgili gen tüm izolatlardan eksprese edilmiştir (Şekil 5 D). *T. annulata* Acarlar izolatının pasaj 9, 116 ve 209. pasajları arasında ekspresyon seviyesi pasaj sayısı arttıkça azalma göstermiştir. Bunun yanında, *T. annulata* Cincin izolatına ait düşük orta ve yüksek pasajlarda genin ekspresyon seviyesi bir dalgalanma göstermiş ve pasaj 10’da belirlenen ekspresyon seviyesi pasaj 148’de artış, pasaj 229’da tekrar belirgin bir düşüş göstermiş ve izolatın en yüksek pasajı olan pasaj 252’de tekrar artışmış ve izolatın pasaj 148’teki seviyelerine çıkmıştır. *T. annulata*Ankara pasaj 16 ve *T. annulata* Ankara/Pendik 66-327 izolatlarında ise HPRT-1 geninin erkspresyon seviyeleri izolatın pasajsayısı arttıkça artmıştır (Şekil 5 D). Bunun yanında, genin en düşük ekspresyon seviyesi aşı suşu olarak kullanılan TeylovacTM’ da belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda izolatlar ve izolatlara ait farklı pasajlardaki HPRT-1 geninin ekspresyon seviyeleri arasında ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



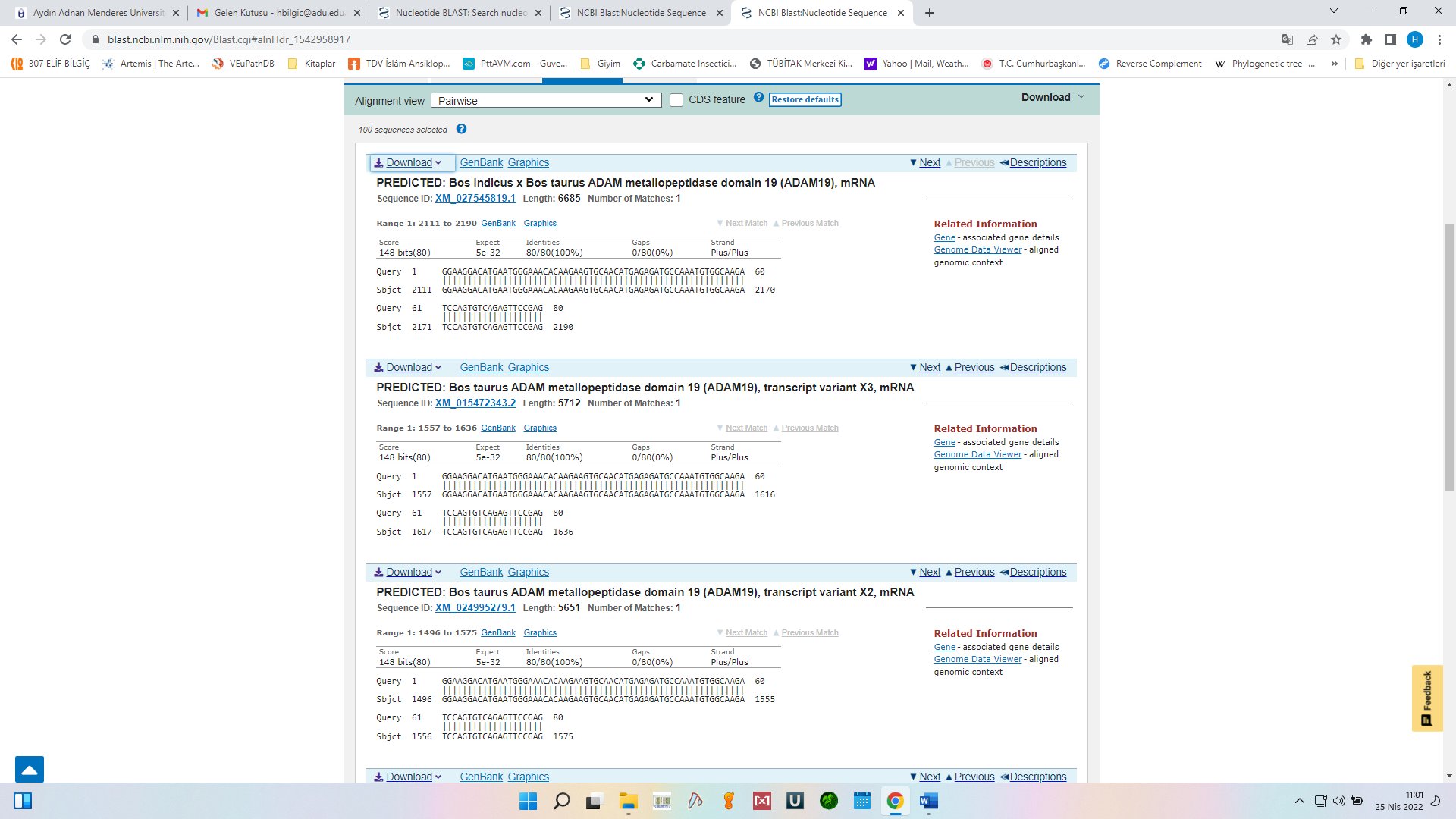
**Şekil 5.** HADC (**A**), TIMP-3 (**B**), ADAM-19 (**C**) ve HRPT-1 (**D**) genlerinin farklı pasajlardaki *T. annulata* izolatlarındaki ekpresyon düzeyleri.

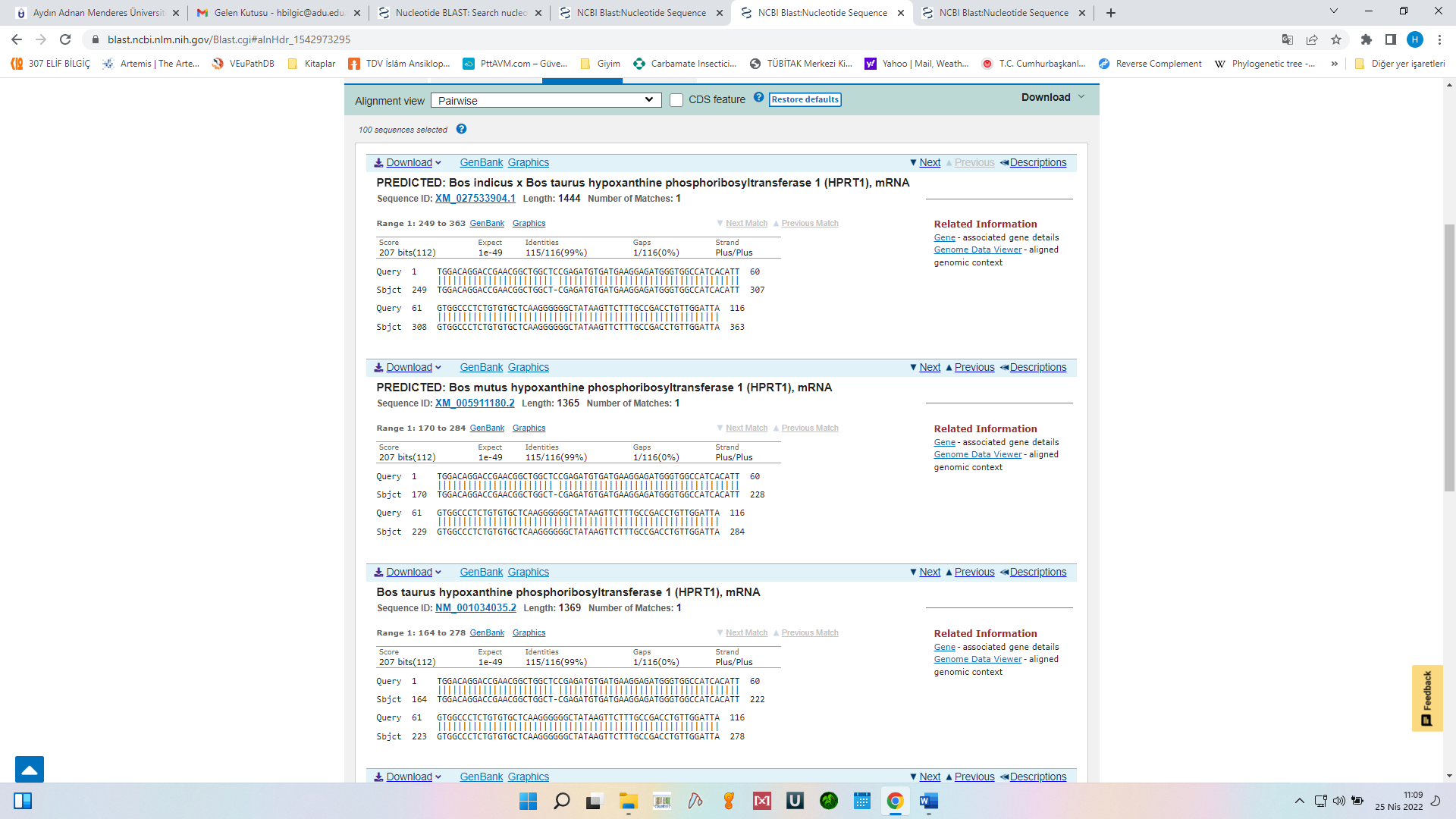
**4.2. Dizilim Sonuçları**

EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilen ve içerisinde klonlanmış halde ADAM-19, TIMP3, HDAC ve HRPT-1 gen bölgelerini (Resim 6) ihtiva eden pCR™4-TOPO™ vektörü içerisine ait pürifiye plazmid DNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri incelendiğinde klonlanan ilgili gen bölgelerinin belirlenen boyutlarda olduğu görülmüştür. Saflaştırılmış plasmid DNA örneklerinin yapılan nükleotid dizilimlerine ait ham veriler ilk etapta Genious R8 (https://www.geneious.com/download/previous-versions/) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu amaçla, klonlanmış her bir gen bölgesini ileri ve geri yönde çevreleyen M13 primer bağlanma bölgelerine özgü primerler kullanılarak çift yönlü dizilim analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar Genious R8 programı kullanılarak bir araya getirilerek ilgili gen bölgelerine ait her bir aday antijeni kodlayan gen bölgesinin dizilimleri oluşturulmuştur. Daha sonra, gen bölgelerine ait dizilim analizler, NCBI veri tabanında (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=) kayıtlı ilgili gen bölgelerine ait referans nükleotid dizilimleri ile karşılaştırmıştır (Şekil 6). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde ADAM-19 gen bölgesinin veri tabanında kayıtlı *Bos indicus* x *Bos taurus* ADAM metallopeptidase domain 19 (XM\_027545819.1) ile, TIMP3 gen bölgesinin veri tabanında kayıtlı *Bos indicus* x *Bos taurus* TIMP metallopeptidase inhibitor 3 (XM\_027541861.1) gen bölgesiyle %100 oranında benzerlik gösterirken, HRPT-1 gen bölgesinin veri tabanında kayıtlı *Bos indicus* x *Bos taurus* hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (XM\_027533904.1) gen bölgesi ile %99 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 6 A-C). Bunun yanında HDAC1 gen bölgesinin veri tabanında kayıtlı *T. annulata* histone deacetylase (TA12690) gen bölgesiyle %99 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 6 D).

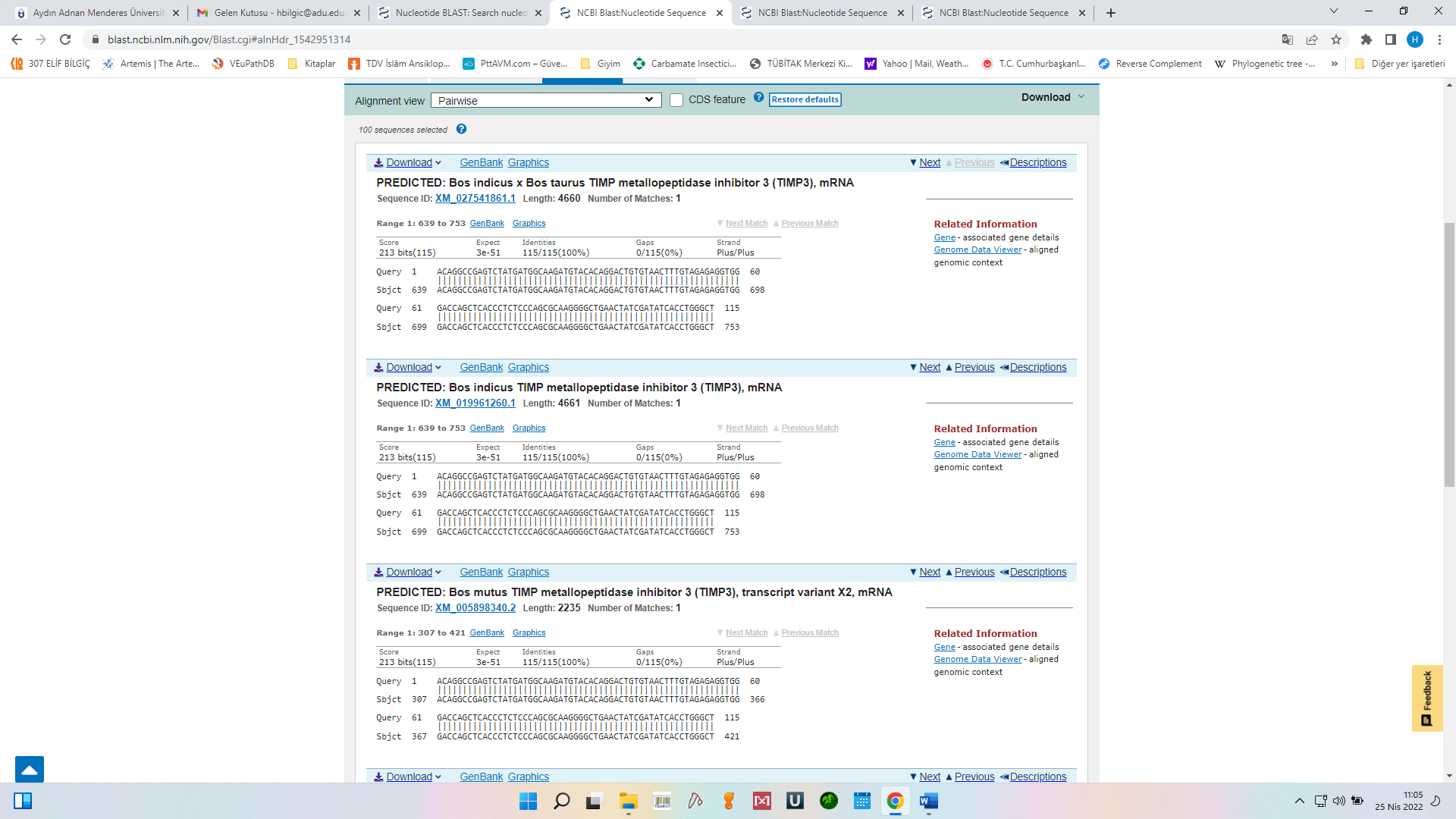


**Resim 6.** pCR™4-TOPO™ vektörü içerisinde klonlanmış ADAM 19, TIMP 3, HDAC ve HRPT 1 gen bölgelerini içeren ait 1µg pürifiye plazmid DNA’nın EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilmesi ile elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüleri. 1, 4, 7 ve 10 ve 13; 100 bp moleküler uzunluk belirleyicileri (Gene DireX H3 RTU, ABD), 2-3; restriksiyon enzimi ile kesilmiş ADAM 19 gen bölgesi ihtiva eden iki farklı koloniden izole edilen 80 bp uzunluktaki pozitif plazmid DNA’sı, 5-6; restriksiyon enzimi ile kesilmiş TIMP 3 gen bölgesi ihtiva eden iki farklı koloniden izole edilen 117 bp uzunluktaki pozitif plazmid DNA’sı, 8-9; restriksiyon enzimi ile kesilmiş HDAC gen bölgesi ihtiva eden iki farklı koloniden izole edilen 230 bp uzunluktaki pozitif plazmid DNA’sı, 11-12; restriksiyon enzimi ile kesilmiş HRPT 1 gen bölgesi ihtiva eden iki farklı koloniden izole edilen 115 bp uzunluktaki pozitif plazmid DNA’sı, 13; 50bp’lık moleküler uzunluk belirleyicileri (Abm, Kanada).

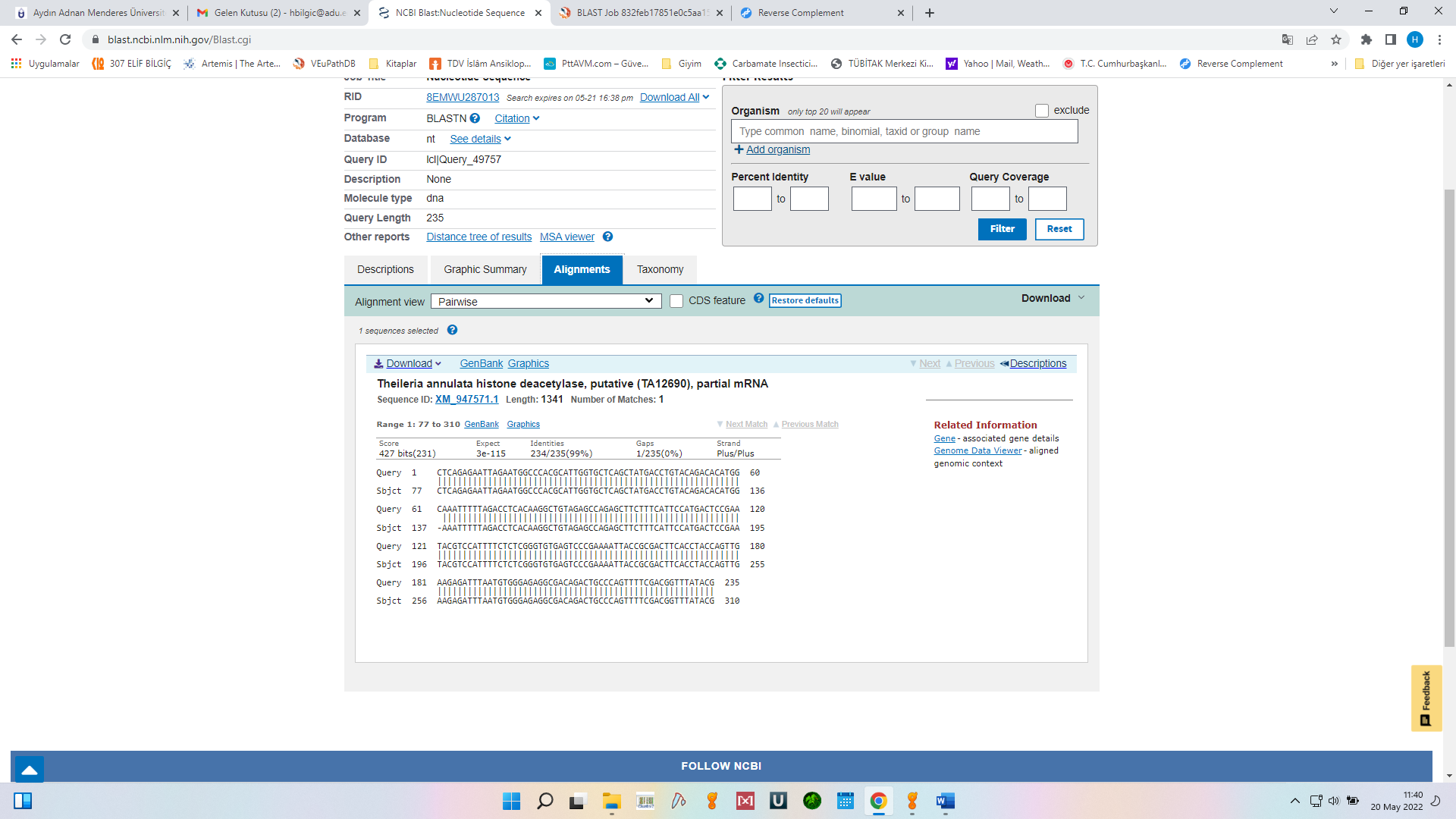
**(A)**

**(B)**

**(C)**



**(D)**



**Şekil 6.** Klonlanarak, pürifiye edilen ADAM-19 (**A**), HRPT-1 (**B**), TIMP3 (**C**) ve HDAC (**D**) gen bölgelerinin dizilim analiz sonuçları ile ve NCBI veri tabanında (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=) kayıtlı ilgili gen bölgelerine ait referans nükleotid dizilimleri ile karşılaştırma sonuçları. Karşılaştırılan nükleotid arasındaki tek nükleotid ve/veya amino asit farklılıkları sırasıyla ‘-’ işareti ile gösterilmektedir.

.

**5. TARTIŞMA**

*Theileria annulata* tarafından oluşturulan tropikal theileriosis ülkemizde sığırlarda görülen kene kaynaklı protozoal hastalıların en önemlilerinden biri olup hastalık Türkiye’nin tüm coğrafi bölgelerinde bildirilmiştir (Sayın ve diğerleri, 2003). Hastalık ile mücadele de (i) enfekte hayvanların tedavi edilmesi, (ii) vektör kene ile mücadele, (iii) hastalığa karşı dirençli ırkların kullanılması, (iv) etkenin kenelere aktarımının engellenmesi ve (iv) aşılamadır.

Tropikal theileriosis’in tedavisinde kullanılan buparvaquone akut vakaların tedavisinde erken dönemlerde tek dozda etkinlik göstermekle birlikte, gecikmiş vakalarda hastalığın ilerleyen dönemlerinde ikinci bir doz uygulamasına ihtiyaç duyulmaktadır (McHardy ve diğerleri, 1987; Dolan ve diğerleri, 1992; Singh ve diğerleri, 1993). Son yıllarda, hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgelerde düzensiz ve yoğun ilaç uygulamasına sonucunda parazitin etken maddeye karşı direnç geliştirdiği ve vakaların tedavilerinde tekrarlanan dozlara rağmen buparvaquon’un yetersiz kaldığına dair bildirimler giderek artmıştır (Mhadhbi ve diğerleri, 2010; Sharifiyazdi ve diğerleri, 2012). Kontrol yöntemleri arasında yer alan diğer bir yöntem olan kene mücadelesi özellikle hastalığın endemik görüldüğü bölgelerde sıkça kullanılan bir yöntemdir (Brown, 1990). Ancak sürekli aynı etken maddeye sahip akarisidal ilaçların kullanılması sonucu gelişen ilaç direnci, kullanılan ilaçların ette veya sütte kalıntı bırakıp bırakmadığına dikkat edilmemesi, kenenin biyolojik döngüsü göz önüne alınmadan yapılan ilaç uygulamaları, bu kontrol yönteminin etkinliğini giderek azaltmaktadır (Pipano, 1989; Tait ve Hall, 1990; Norval ve diğerleri, 1992). Ayrıca hayvan barınakları ve yakın alanlarda kenelerin üremesine uygun alanların rehabilite edilmesi de keneler ile mücadele için göz önünde bulundurulması gereken diğer bir önemli noktadır.

Kenelerle bulaşan hastalıkların kontrolünde geçerli olan alternatif bir stratejide hastalıklara karşı dirençli ve/veya dayanıklı ırkların geliştirilmesi veya seçilmesidir. Uzun vade de hem theileriosis hem de vektör kene enfestasyonuna karşı dirençli ırkların kullanılması hastalığın kontrolünde önemlidir (Brown 1990). Teknolojideki ilerlemeler, belirteçler kullanarak bazı hastalıklara karşı dirençli ve/veya dayanıklıktan sorumlu genlerin tanımlanarak patojenlere karşı dirençli ve/veya dayanıklı fenotiplerin seçilebilmesine olanak sağlamıştır. Endemik bölgelerde yaşayan çeşitli yerli ırklar, Holstein gibi yerli olmayan, yüksek verimli, ithal sığırlara kıyasla *T. annulata*'ya karşı bir dereceye kadar direnç gösterebilmektedir. (Bakheit ve Latif 2002; Darghouth ve diğerleri,1999; Glass ve diğerleri, 2005; 2012; Preston ve diğerleri, 1992). Bununla birlikte, fenotipik düzeyde gözlenen bu bağışıklığın genetik alt yapısının ortaya konarak ilgili dirençli ve/veya dayanıklığın ayrıntılı olarak ortaya konulacağı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çiftlik hayvanlarında görülen ve keneler tarafından aktarılan kan parazitleri tarafından oluşturulan hastalıklara karşı korunmada kullanılan en etkili yöntemlerden biride aşılamadır. Tropikal theileriosis’ten korunmada en etkili yöntemlerden biri olan aşılama denemeleri ilk olarak 1930’lu yıllarda başlamıştır. İlerleyen yıllarda şizontla enfekte mononükleer hücrelerin *in vitro* ortamda canlılıklarını koruyabildiğinin belirlenmesi atenüye canlı aşıların gelişmesinde pozitif yönde etki etmiştir (Onar, 1989; Pipano, 1989a, 1989b; Brown, 1990). Enfekte mononükleer hücrelerin *in vitro* ortamda pasaj sayısı arttıkça atenüasyon oranı da artmaktadır. Aşılamada kullanılacak canlı atenüye hücre hatlarındaki atenüasyon düzeylerinin etkin olarak belirlenebilmesi için, *in vivo* hayvan deneyleri ve bu deneylerden elde edilen parazitololojik, hematolojik ve biyokimyasal analizlere ihtiyaç duyulmaktadır (Darghouth, 2008). Bunun yanında, pasajlama ile birlikte hücre hatlarında genetik düzeyde, metastaza yardımcı olan ve patojeniteyi attıran gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerinde değişiklik gözlendiği bildirilmiştir (Ouhelli ve diğerleri, 1989; Ilhan, 1995). Aşılamada kullanılacak olan hücre hatları ile yapılması gerekli olan deneysel enfeksiyon basamaklarının atlanarak zaman ve maliyet tasarrufu sağlayacak olması, bunun yanında klinik, parazitolojik ve kan parametrelerine ihtiyaç duymadan daha kolay sonuç alınabilir bir yöntem olarak *T. annulata*’ya özgü atenüasyon markerları ile atenüasyon düzeyini tespit edilmesi ön plana çıkmaktadır (Echebli ve diğerleri, 2014). Bu amaçla tez çalışmasında, aşılamada kullanılacak olan bölgesel izolatların atenüasyon seviyelerinin tespit edilmesinde kullanılabilecek *T. annulata*’ya özgü belirteçlerin parazitin düşük, orta ve yüksek pasajlarındaki ekspresyon seviyelerindeki değişimler ve belirteçlerin etkinliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

*Theileria* şizontları ile enfekte lenfoid hücrelerde meydana gelen en erken olaylardan biri, AP-1 öncüllü MMP9 gen ekspresyonundaki azalmadır (Darghouth, 2008; Baylis ve diğerleri, 1995). Ayrıca enfekte lenfoid hücre kültürlerinde meydana gelen transformasyonun esas öncüleri olan JNK (Echebli ve diğerleri, 2014) ve AP-1’in aktivitesiyle bağıntılı MMP9 (Sommerville ve diğerleri, 1998), CD69, ICAM-1, CD49, ITGB5, ADAM-19, TIMP-3, HRPT-1 ve histone deactylases (HDACs) (Grützbach ve diğerleri, 2016), ısı şok protein 90 (HSP90) (Mohammed ve diğerleri, 2016) gibi gen bölgeleri atenüasyon seviyesinin belirlenmesinde etkili olmaktadır. Bu çalışmada, atenüasyon seviyesinin tespiti için parazit ve/veya konak hücre kökenli toplam 10 marker ile her gen bölgesine özgü primerler kullanılarak yapılan PZR ön denemelerinde Tunus ve Türkiye izolatı olan 5 örnek kullanılmıştır. Yapılan PZR’da HRPT-1, TIMP-3, ADAM-19, HDAC’s (TA12690) markerlarının istenilen bölgelerde bant verdiği ve dolayısı ile hedef gen bölgesinin istenilen bölgesini çoğaltıldığı tespit edilmiştir. CD49, CD69, HSP90, ITGB-5, MMP9, ICAM-1 atenüasyon markerları ile yapılan ön PZR denemelerinde ise herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir. AP-1 aktivasyonuyla ilişkili olan CD49, CD69, ITGB-5, ICAM-1 ve MMP9 gen bölgelerinin ekspresyon seviyesi AP-1 aktivasyonu ile doğru orantılıdır. Yapılan çalışmalarda, MMP9, ICAM-1, CD49, CD69, ITGB-5, ADAM-19 ekspresyon seviyeleri enfekte düşük pasaj hücre hattında daha fazla eksprese edilmiştir (Echebli ve diğerleri, 2014). Sonuç olarak düşük pasajlarda ekspresyon seviyesinin fazla olması beklenmektedir (Adamson ve diğerleri, 2000; Berberich ve diğerleri, 1994; Metheni ve diğerleri, 2014). Echebli ve diğerleri (2014), Tunus izolatı kullanarak yaptığı çalışmada belirtilen CD49, CD69, ITGB-5, ICAM-1, MMP9 bölgesinde de ekspresyon tespit edilmiştir. Bu çalışmada, PZR ön denemelerinde kullanılan izolatlar düşük pasaj seviyesine sahip olmasına karşın belirtilen gen bölgelerinde çoğalma olmamıştır. Özellikle CD49, CD69 ve ICAM-1 moleküllerinin T hücre yanıtında rol almasına rağmen bu tez çalışmasında çoğalma göstermemesi, bölgeler arasında *T. annulata* izolatları ve/veya konak hücrelerde genetik düzeyde görülen polimorfizm kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir (Preston ve diğerleri, 1999).

*Theilera*’nın metastazına destek olan bir diğer gen bölgesi de histon deasetilaz (HDAC)’dır. HDAC geni ökaryotlarda, histon ve histon olmayan substratların hiperasetilasyonu yoluyla bir dizi hücresel ve moleküler etkiyi indüklemekte ve anormal ekspresyonları veya aktiviteleri kanser gelişimine yol açmaktadır (Gallinari ve diğerleri, 2007; Li ve Seto, 2016). Bunun sonucunda da tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu baskılayabilmekte ya da onkojenik hücre sinyal yolunu düzenleyebilmektedir (Li ve Seto, 2017). HDAC enzimlerinin, protein-protein etkileşimleri, hücrenin hayatta kalması ve farklılaşması gibi önemli rolleri bulunmaktadır. Bu tip hücre döngüsü aşamalarının malign transformasyondan etkilenmesi sonucu HDAC inhibitörleri antineoplastik ilaçlar olarak geliştirilmiştir (Gallinari ve diğerleri, 2007). *T. annulata* ile enfekte sığır hücre kültüründe anti-theilerial aktivite gösteren vorinostat, romidepsin, belinostat ve panobinostat gibi HDAC intibitörleri ve kontrol olarak buparvaquan kullanılan bir çalışmada panobinostat dışındaki, diğer tüm inhibitörlerin, güçlü antiparaziter aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Vorinostat, belinostat, romidepsin (<0,3 mM) değerleri, panobinostat (20 mM) bileşiğinden en az 20 kat daha düşük bulunmuştur. Bu dört HDAC inhibitörünün daha önce yapılan çalışmalarda *P. falciparum* ve *P. knowlesi* suşlarına karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Engel ve diğerleri, 2015). Bu tez çalışmasında, tüm izolatlarda yüksek seviyelerde ekspere edilen HDAC geni, yalnızca Ankara ve Ankara / Pendik izolatlarında pasaj sayısının artmasına bağlı olarak ekspresyon seviyesi düşmüş ve diğer çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Ancak diğer izolatlarda anlamlı bir azalış belirlenememiş ve en yüksek ekpresyon aşı suşunda tespit edilmiştir. Bu durum, beklenenin aksine HDAC gen bölgesi tarafından eksprese edilen enzimlerin Ankara ve Ankara / Pendik izolatları haricinde diğer izolatlar ile TeylovacTM’de atenüasyonla birlikte azalmak yerine dalgalı bir seyir gösterdiği ve yüksek pasajlarda düşük ve / veya orta düzeydeki pasajlara kıyasla daha yüksek seviyelerde eksprese edildiğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar bize HDAC gen bölgesinin Ankara ve Ankara / Pendik izolatlarında belli düzeyde bir düşüş gösterse de çalışmada kullanılan diğer izolatlar ve aşı suşu için uygun bir belirteç olamayacağını göstertmiştir.

Enfekte düşük hücre kültürü pasajlarında metastazik aktivitenin atenüye hücre hattına oranla daha fazla olduğu ve birçok kanser dokusunda MMP'lerin yüksek ekspresyonu ve aktivasyonu rapor edilmiştir (Egeblad ve Werb, 2002). Matrix metalloproteinazların ekspresyonunun artması ve inhibitörleri olan TIMP’lerin ekspresyonunun azalması *Theileria* türleri ile enfekte hücrelerde de metastazı arttırmaktadır (Rundhaug, 2003). Buna karşın *T. annulata* ile enfekte makrofajların hücre kültüründe pasaj sayısı arttıkça AP-1 öncülüğündeki MMP9 gen ekspresyonu azalmaktadır (Baylis ve diğerleri,1995; Hall ve diğerleri, 1995). MMP9 gen aktivitesinin enfekte düşük pasaj hücre hattında daha fazla eksprese edildiği buna karşın TIMP-3 geninin atenüye hücre hattında daha fazla eksprese edildiği tespit edilmiştir (Echebli ve diğerleri, 2014). Bu tez çalışmasında yapılan incelemelerde, Acarlar izolatında ilgili gen bölgesinin ekspresyon seviyesinin beklendiği şekilde izolata ait pasaj sayısı arttıkça azalması beklendiği şekilde diğer çalışmalarla benzer çıkmıştır. Bununla birlikte, bir diğer izolat olan Cincin’in sadece düşük pasajında az bir seviyede eksprese edilen TIMP-3 geni, aynı izolatın orta ve yüksek pasajlarında eksprese edilememe nedeninin, ölçülemeyecek kadar az eksprese olmasından kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Ancak, bu çıkarımın ileride yapılacak ileri düzey, yeni nesil RNA-sekanslama analizleri ile açıklığa kavuşturulması gereklidir. TIMP-3 geninin, aşı suşu olarak kullanılan TeylovacTM ile orta ve yüksek pasajlı Ankara izolatında eksprese edilmemesinin nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Bu izolatın orta ve yüksek pasajlarında atenüasyon esnasında konak hücre genlerinde oluşması muhtemel bir translasyon sonrası modifikasyon kaynaklı olabileceğini akla getirmektedir.

Matrix metalloproteinazlar ile ilişkili bir metalloproteinaz ailesi olan ADAM protein ailesi diğer transmembran proteinlerin proteolitik işlenmesinde, hücre yapışmasında ve hücre sinyal yollarında yer alan proteinlerdir ve kanser hücrelerinde metastazına yardımcı olmaktadırlar. ADAM protein ailesinde yer alan ADAM-19 proteini ülseratif kolitli hastalarda (Franzè ve diğerleri, 2013) ve insanlarda özellikle beyin ve böbrek tümörlerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir (Mochizuki ve Okada, 2007). *Theileria* ile enfekte makrofajlarda ADAM19 geni membrana bağlı TNF’ün salınımını arttırmaktadır (Zheng ve diğerleri, 2004). Bu tez çalışmasında, Acarlar ve Cincin izolatlarında ADAM-19 gen ekspresyon seviyesi atenüasyon arttıkça azalma eğilimi göstermiştir. ADAM protein ailesinde yer alan proteinler sentezlendikten sonra TGF-α gibi büyüme faktörlerinde değişimler meydana getirerek kanser hücrelerinin yüzeylerindeki sinyalleri değiştirip hücre proliferasyonunun artmasına neden olabilmektedirler (Mochizuki ve Okada, 2007). Bu durum, ilgili izolatlarda pasaj sayısındaki artış ile bu hücre hatlarının kanser hücresi benzeri metastazik ve proliferatif aktivitelerinde azalma olduğunu göstermektedir. Ancak, Acarlar ve Cincin izolatlarında gözlenen benzer durum Ankara / Pendik izolatında gözlenmemiş ve izolatın düşük ve orta seviyedeki pasajlarında ADAM-19 gen ekspresyonu yüksek pasaja göre yaklaşık %90 oranında artış göstermiştir. Aşı suşunda (TeylovacTM) ise diğer çalışmaların aksine yüksek bir ekspresyon belirlenmiştir. ADAM-19 geninin, Acarlar ve Cincin izolatlarının yüksek pasajlarındaki azalmanın aksine *T. annulata* / Pendik pasaj 366 ve TeylovacTM’da ciddi oranda artış göstermesi ilgili izolatlardaki kanser hücresi benzeri metastazik ve proliferatif aktivitelerinde azalmadığına veya ilgili genin ekspresyon düzeyinin ilgili izolatların atenüasyon düzeyi ve pasaj sayısı arasındaki ilişkiyi yeterince yansıtamadığını göstermektedir.

Hipoksantin fosforibosiltransferaz-1 (HPRT), patolojide hipoksik koşullar altında hücrenin pürin nükleotid kaynaklarını korumaya yardımcı olan kritik bir yolakta rol oynamaktadır (Wu ve diğerleri, 2015). HPRT-1, omurgalılarda serbest pürin ve pirimidin bazlarının dönüşüm aktiviteleri katalize eden ve mutasyon araştırmalarında endojen bir kontrol olarak yaygın olarak kullanılan bir gen bölgesidir. HRPT gen bölgesindeki eksiklik, mutasyona sebep olmakta ve ilgili gen bölgesinin *T. annulata* ile enfekte sığır lenfositlerinde parazit yükünün değerlendirilmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir. (Nguyen ve diğerleri, 2011). Bu tez çalışmasında, farklı *T. annulata* izolatlarına ait hücre hatlarının düşük, orta ve yüksek pasajlarında HRPT genin ekspresyon seviyesinin incelenmesi sonucunda aşı suşu olarak kullanılan TeylovacTM’de tespit edilen en düşük ekspresyon seviyesi aşı suşundaki parazit yükünün atenüasyon ile birlikte azaldığına işaret etmektedir. Acarlar izolatının yüksek pasajında (pasaj 209) düşük pasaja kıyasla yaklaşık %27 düzeyinde bir azalma gözlenmiştir. Ancak, aynı duruma Cincin ve Ankara / Pendik izolatlarının yüksek pasajlarında (>200) karşılaşılmamış ve bu pasajlarda ekspresyon seviyesi düşük ve / veya orta düzeydeki pasajlara kısayla artış göstermiştir. Bu durum, bize *T. annulata*’nın farklı izolatlarına ait düşük, orta ve yüksek pasajlarında HPRT-1 geninin ekspresyonunun değişkenlik gösterdiği ve elde edilen verilerin mutlaka ilgili izolatlardaki parazit yükü ile karşılaştırılmasının faydalı olacağını göstermiştir.

**6. SONUÇ ve ÖNERİLER**

Canlı aşıların, saha şartlarında etkin bir şekilde kullanılabilmesi için izole edilen makrosizontla enfekte hücre hatlarının uzun zaman alan bir attenüasyona tabi tutulmaları gerekmektedir. Atenüasyon esnasında parazit, sadece hastalık yapma yeteneğini kaybetmeli ancak aşılanan hayvanlarda hastalığa karşı koruyuculuk oluşturabilecek derecede humoral ve/veya hücresel bir bağışıklık sağlayabilmelidir. Tropikal theileriosisden korunmada kullanılan en etkili yollardan biri olan atenüye hücre kültürü aşıları 1930’lu yıllarda Cezayir’de başlayarak Türkiye dahil birçok ülkede yaygın halde kullanılmaktadır (Pipano, 1997; 1989 Sayın ve diğerleri, 2004; Karagenç ve Bilgiç, 2013). *T. annulata* enfeksiyonlarına karşı kullanılan atenüye canlı aşıların hayvanlarda hastalığa yol açmadan etkin bir korumada sağlayabilmeleri için kullanılacak hücre hattının atenüasyon seviyesinin tespiti oldukça önemlidir.

Atenüasyonun tespit edilmesi için, belli sayıda pasajlanmış olan hücre hatları kullanılarak aralıklarla deneysel enfeksiyonlar oluşturulmakta ve bu hayvanlarda parazitolojik, klinik, kan ve biyokimyasal analizler yapılarak ilgili pasajlarda hücre hatlarının koruyucukları ve hastalık oluşturup oluşturmadıkları tespit edilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda, yapılan çalışmalar ile atenüasyon seviyelerinin genetik belirteçler kullanılarak tespit edilmesine yönelik çalışmalar yapılmış ve olumlu geri bildirimler alınmıştır (Echibi ve arkadaşları, 2014). Bu tez çalışmasında, daha önceki yıllarda yapılmış çalışmalarda iyi birer atenüasyon belirteci olacağı bildirilen konak hücre ve parazit tabanlı gen bölgelerinin düşük, orta ve yüksek pasajlı farklı *T. annulata* izolatlarındaki ekspresyon seviyelerinin aşı suşu olarak kullanılan TeylovacTM ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında, incelenen moleküler belirteçlerin bazılarının ekspresyon seviyelerinin bazı izolatlara ait düşük, orta ve yüksek pasajlarda (HDAC; Ankara/Pendik, TIMP-3; Acarlar, ADAM-19; Acarlar ve Cincin, HPRT-1; Cincin gibi) beklenen azalmaları göstermiş olmasına karşın gerek kullanılan diğer izolatlarda gereksede aşı suşunda istenilen seviyelerde olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, ilgili gen bölgelerinin hali hazırda *T. annulata* makroşizontları ile enfekte hücre hatlarındaki atenüasyon seviyelerinin belirlenmesinde tam olarak yeterli olmayacağı ortaya çıkmıştır. Elde edilen bulgular bize atenüasyon belirteci olarak kullanılan ve/veya kullanılacak olan gen bölgeleri üzerine daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermiştir.

**7. KAYNAKLAR**

Abdela, N. (2016). Important Cattle Ticks and Tick Born Haemoparasitic Disease in Ethiopia. A review. *Acta Parasitologica Globalis*,7(1):12-20.

Adamson, R., Logan M., Kinnaird J., Langsley G., Hall R. (2000). Loss of matrix metalloproteinase 9 activity in *Theileria annulata*-attenuated cells is at the transcriptional level and is associated with differentially expressed AP-1 species. *Molecular and Biochemical Parasitology*,106 (1):51-61. Doi: 10.1016/s0166-6851(99)00213-3

Adamson, R., Hall R. (2002). Virulence and attenuation in *Theileria annulata.* In: Dobbelaere, D., Mckeever, D. *World Class Parasites 3 Theileria* (pp.55-67). Boston/ Dordrecht/ London: Kluwer Academic Publishers.

Akoolo, L., Pelle, R., Saya, R., Awino, E., Nyanjui, J., Taracha EL, … Graham SP. (2008). Evaluation of the recognition of *Theileria* *parva* vaccine candidate antigens by cytotoxic T lymphocytes from Zebu cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 121 (3-4): 216-21.

Aktas, M., Dumanlı, N., Çetinkaya, B., Çakmak, A. (2002). Field evaluation of PCR in detecting *Theileria annulata* infection in cattle in the east of Turkey. *Veterinary Record*, 150: 548-549.

Alaçam, E., Şahal, M. (1997). *Sığır Hastalıkları*. Alaçam, E., Şahal, M (Ed), 1. Baskı. Ankara: Medisan.

Amira, A.H., Ahmed, L., Ahmed, J., Nijhof, A., Clausen, P.H. (2018). Epidemiological study on tropical theileriosis (Theileria annulata infection) in the Egyptian Oases with special reference to themolecular characterization of Theileria spp. *Ticks and Tick-borne Diseases* ,9:1489-93.

Amour, A., Knight, C.G., English, W.R. (2002). The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. *Federation of European Biochemical Societies* (*FEBS) Letters*, 524: 154–8.

Anon, A. (1984). *Tick and tick-borne disease control*. A practical field manual, food and agriculture organization of the United nations, Rome Vol:2, p: 300-621.

Apoptosis. Erişim adresi: <http://biyokimya.8m>. net/apopitosiz.html. Erişim Tarihi: 10.02. 2011.

Aysul, N., Karagenç, T., Eren, H., Aypak, S., Bakirci, S. (2008). Prevalence of tropical theileriosis in cattle in the Aydin region and determination of efficacy of attenuated *Theileria annulata* vaccine. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32(4): 322-7.

Aytuğ, C.N., Alaçam, E., Özkoç, Ü., Gökçen, H., Türker, H. (1990). *Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği*. Aytuğ CN, editör. 1. Baskı. İstanbul: Teknografikbbbb Matbaası; p.205-6.

Bai, Q., Liu, G.Y., Yin, H., Zhao, Q.Z., Liu, D.K., Ren, J.X., Li, X. (2002a). *Theileria sinensis* study on classical taxonomy. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 33:73–77.

Bai, Q., Liu, G.Y., Yin, H., Zhao, Q.Z., Liu, D.K., Ren, J.X., Li, X. (2002b). *Theileria sinensis* a new species of Bovine *Theileria* molecular taxonomic studies. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 33: 185–190.

Baker, A.H., Edwards, D.R., Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115: 3719–27.

Bakheit, M.A. ve Latif, A.A. (2002) The innate resistance of Kenana cattle to tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in the Sudan. *Ann N Y Acad Sci*., 969, 159-163.

Barnett, S.F. (1977). *Babesia, Theileria, Myxosporida, Microsporida, Bartonellaceae, Anaplasmataceae, Ehrlichia and Pneumocystis,* Kreier JP (ed), *Parasitic Protozoa IV*, *Academic Press*, 77-113, London.

Bakırcı, S. (2009). *Batı Anadolu sığırlarında görülen kene türleri ve yaygınlığı.* Doktora tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Bakor, B. (2008*). Epidemiology of Tropical Theileriosis in Nyala Dairy Farms in South Darfur State*. Master Thesis, UOFK. Sudan, pp.125.

Barman, M., Kamble, S., Roy, S., Bhandari V., Singothu, S., Dandasena, D., … Sharma P. (2021). Antitheilerial activity of the anticancer histone deacetylase inhibitors. *Frontiers in Microbiology,* 12:759817.

Barnett, S.F., Ed, Weinman, D., Ristic, M. (1968). Theileriosis. *Infectious Blood Diseases of Man and Animal Diseases Caused by Protista*. New York: *Academic Press,* p: 269-325.

Baylis, H.A., Megson, A., Hall, R. (1995). Infection with *Theileria annulata* induces expression of matrix metalloproteinase 9 and transcription factor AP-1 in bovine leucocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 69: 211–222.

Ben Miled, L., Dellagi, K., Bernard, G., Melrose, T.R., Darghouth, M., Bouattour, A., … Brown, C.G.D. (1994). Genomic and phenotypic diversity of Tunisian *Theileria annulata* isolates. *Parasitology*, 108: 51-60.

Berberich, I., Shu, G.L., Clark, E.A. (1994). Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *Journal of Immunology,* 153: 4357–4366.

Bhattacharyulu, Y., Chaudhri, R.P., Gill, B.S. (1975). Studies on the development of *Theileria annulata* in the Tick-*Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Parasitology*, 50: 397-408.

Bilgiç, H.B. (2010). *Theileria annulata’nın tanısında serolojik (Indirekt ELISA) ve moleküler (PZR, Çoklu PZR ve LAMP) yöntemlerin geliştirilmesi*, Doktora tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Bilgiç, H.B., Bakırcı, S., Köse, O., Ünlü, A.H., Hacılarlıoğlu, S., Eren, H., … Karagenç, T. (2017) Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. *Parasites & Vectors* 10(1):211. https:// doi. org/ 10. 1186/ s13071- 017- 2151-3.

Bilgiç, H.B., Karagenç, T., Shiels, B., Tait, A., Eren, H., Weir, W. (2010). Evaluation of cytochrome b as a sensitive target for PCR-based detection of T. annulata carrier animals, *Veterinary Parasitology*, 174: 341–347.

Bilgiç, H.B., Karagenç, T., Simuunza, M., Shiels, B., Tait, A., Eren, H., William, W. (2013) Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Experimental Parasitology*, 133 (2): 222–229.

Bishop, R.P., Odongo, D.O., Mann, D.J., Pearson, T.W., Sugimoto, C., Haines, L.R., … Villiers, E.P. (2009). Genome mapping and genomics in animal-associated microbes. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 6: 191- 231.

Bishop, R.P., Spooner, P.R., Kanhai, G.K., Kiarie, J., Latif, A.A., Hove, T., Masaka, S., Dolan, T.T. (1994). Molecular characterizationof *Theileria* parasites: application to the epidemiology of theileriosis in Zimbabwe. *Parasitology*, 109(5): 573-581.

Bonig, H., Wundes, A., Chang, K.H., Lucas, S. (2008). T. Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab. *Blood*, 111: 3439–3441.

Botteron, C., Dobbelaere, D. (1998). AP-1 and ATF-2 are constitutively activated via the JNK pathway in *Theileria parva*-transformed T-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 246: 418–421.

Boulter, N., Hall, R. (1999). Immunity and vaccine development in the bovine theilerioses. *Advences in Parasitology*, 44: 41-97.

Brown, C.G.D. (1990). Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of *cattle*. *Parassitologia*, 32: 23-31.

Burridge, M.J., Brown, C.G., Kimber, C.D. (1974). *Theileria annulata*: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. *Experimental Parasitology*, 35: 374–380.

Burridge, M.J., Kimber, C.D. (1973). Duration of serological response to the indirect fluorescent antibody test of cattle recovered from *Theileria parva* infection. *Research in Veterinary Science,* 14: 270–271.

Caccio, S., Camma, C., Onuma, M., Severini, C. (2000). The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *International Journal of Parasitology*, 30: 1181-1185.

Caskey, T.C. (1987). Disease diagnosis by recombinant DNA methods. *Science*, 236: 1223- 1228.

Chae, J.S., Allsopp, B.A., Waghela, S.D., Park, J.H., Kukuda, T., Sugimoto, C., Allsopp, MTEP., Wagner, G.G., Holman, P.J. (1999). A study of the systematics of *Theileria spp.* Based upon small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research,* 85: 877- 883.

Chae, J.S., Allsopp, B.A., Waghela, S.D., Park, J.H., Kukuda, T., Sugimoto, C., Allsopp, M.T.E.P., Wagner, G.G., Holman, P.J. (1999). A study of the systematics of *Theileria spp.* Based upon small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85: 877- 883.

Chaussepied, M., Lallemand, D., Moreau, M.F., Adamson, R., Hall, R. (1998). Upregulation of Jun and Fos family members and permanent JNK activity lead to constitutive AP-1 activation in *Theileria*-transformed leukocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 94: 215–226.

Chaussepied, M., Langsley, G. (1996). *Theileria* transformation of bovine leukocytes: a parasite model for the study of lymphoproliferation. *Research in Immunology,* 147: 127–138.

Chesneau, V., Becherer, J.D., Zheng, Y. (2003). Catalytic properties of ADAM19. *Journal of Biological Chemistry,* 278: 22 331–40.

Chhatwal, G.S., Preissner, K.T., Muller-Berghaus, G., Blobel, H. (1987). Specificbinding of the human S protein (vitronectin) to streptococci, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli. Infection and Immunity* ,55: 1878–1883.

Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R., Irwin, P.J. (2006). New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Veterinary Parasitology*, 142: 238-247.

Dal-Bo, M., Bertoni, F., Forconi, F., Zucchetto, A., Bomben, R., Marasca, R. (2009). Intrinsic and extrinsic factors influencing the clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia: prognostic markers with pathogenetic relevance. *Journal of Translational Medicine*, 7: 76

Dana, K.J., Nathans, D. (1971). *Spesific cleavage of SV40 DNA by restriction endonucleases of Hemophilus influenzae*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 68: 2913, USA.

Darghouth, M.A., Bouattour, A., Kilan, M. (1999) Tropical theileriosis in Tunisia: epidemiology and control. *Parassitologia*, 41 Suppl 1: 33-36.de Kok, J.B., d'Oliveira, C., Jongejan, F. (1993). Detection of the protozoan parasite *Theileria annulata* in *Hyalomma* ticks by the polymerase chain reaction. *Experimental and Applied Acarology*, 17: 839-846.

Darghouth, M.E., Bouattour, A., Ben Miled, L., Sassi, L. (1996). Diagnosis of *Theileria annulata* infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. *Veterinary Research*, 27: 613–621.

De Vos, A.J., Bessenger, R., Banting, L.F. (1981). *Theileria taurotragi*: a probable agent of bovine cerebral theileriosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 48: 177-178.

Demessie, Y., Derso, S. (2015). Tick Borne Hemoparasitic Diseases of Ruminants. A Review. *Advances in Biological Research* ,9(4): 210-24.

Dhar, S., Guatam, O.P. (1977). Indirect fluorenscent antibody test for serodiagnosis in cattle infected with *Theileria annulata*. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 47: 720–723.

Dhar, S., Malhotra, D.V., Bhushan, C., Gautam, O.P. (1986). Chemotherapy of *Theileria annulata* infection with buparvaquone. *Veterinary Record*, 119 (25-26): 635-636.

Dhar, S., Malhotra, D.V., Bhushan, C., Gautam, O.P. (1988). Treatment of experimentally induced *Theileria annulata* infection in cross-bred calves with buparvaquone. *Veterinary Parasitology*, 27 (3-4): 267-275.

Dinçer, Ş., Sayın, F., Karaer, Z., Çakmak, A., FriedholT, K.T., Müller, I., … Eren, H. (1991). Karadeniz bölgesi sığırlarında bulunan kan parazitlerinin serolojisi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 38 (1-2) 206-226.

Dobbelaere, D., Volker, T.H. (1999). Transformation of leukocytes by *Theileria* *parva* and *T. annulata. Annual Review of Microbiology,* 53: 1-46.

Dolan, T.T., Injairu, R., Gisemba, F., Maina, J.N., Mbadi, G., Mbwiria, S.K., Mulela, G.H.M., Othieno, D.A.O. (1992). A clinical trial of buparvaquone in the treatment of East Coast fever. *Veterinary Record*, 130: 536-538.

d'Oliveira, C., van der, W.M., Habela, M.A., Jacquiet, P., Jongejan, F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*,33: 2665-2669.

d'Oliveira, C., van der, W.M., Jacquiet, P., Jongejan, F. (1997). Detection of *Theileria annulata* by the PCR in ticks (Acari: Ixodidae) collected from cattle in Mauritania. *Experimental and Applied Acarology*, 21: 279-291.

Dschunkowsky, E. ve Luhs, J. (1904). Die piroplasmosen der rinder, zentralblatt fur bacteriology. *Parasitenkunde*, Infectionskraukheiten und Hygiene. Abteilung I. originale 35, 486-492.

Dschunkowsky, E., Luhs, J. (1904). Die piroplasmosen der rinder, zentralblatt fur bacteriology. Parasitenkunde, Infectionskraukheiten und Hygiene. Abteilung I. Originale, 35, 486-492.

Dumanlı, N. (1987). *Theileria annulata*’nın sebep olduğu sığır theileriosisinin *Hyalomma excavatum* ile nakli üzerine deneysel araştırmalar. *Türkiye Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*, 11(1): 14-26.

Dumanlı, N., Aktaş, M., Çetinkaya, B., Çakmak, A., Köroğlu, E., Şaki, C.E., … Karahan, M. (2002). Bazı Doğu ve Güneydoğu illerinde theileriosisin yayılışının mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu.*

Dumanli, N., Aktas, M., Cetinkaya, B., Cakmak, A., Koroglu, E., Saki, C.E., … Altay, K. (2005). Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Veterinary Parasitology*, 127: 9-15.

Echebli N., Mhadhbi M., Chaussepied M., Vayssettes C., Di Santo J.P., et al. (2014) Engineering attenuated virulence of a *Theileria annulata*–infected macrophage. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(11): e3183. Doi: 10.1371/journal.pntd.0003183.

Egeblad, M., Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* ,2: 161–74.

Eren, H., Çakmak, A., Yukarı, B.A. (1995). *Türkiye’ nin farklı bölgelerinde Theileria annulata*’ *nın seroprevalansı*. *Ankara Ünviversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 42 1: 57-60.

Erkul, H.M. (1967). Ege Bölgesi sıgırlarında piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. *Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 8 (ı 6) 120-130.

Fawcett, D., Musoke, A., Voigt, W. (1984). Interaction of sporozoites of *Theileria parva* with bovine lymphocytes in vitro I. Early events after invasion. *Cell and Tissue Research*, 16: 873-884.

Finnemann, S.C., Bonilha, V.L., Marmorstein, A.D., Rodriguez-Boulan, E. (1997). Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requiresalpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, U S A 94: 12932–12937.

Flach, E.J., Ouhelli, H. (1992). The epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection in cattle) in an endemic area of Morocco. *Veterinary Parasitology*, 44 (1-2): 51-65.

Flach, E.J., Ouhelli, H., Waddington, D., Oudich, M., Spooner, R.L. (1995). Factors influencing the transmission and incidence of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in Morocco. *Veterinary Parasitology*, 59 (3-4): 177-188.

Forsyth, L.M., Minns, F.C., Kirvar, E., Adamson, R.E., Hall, F.R., McOrist, S., … Preston, P.M. (1999). Tissue damage in cattle infected with *Theileria annulata* accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes. *Journal of Comperative Pathology*, 120: 39-57.

Franze, E., Caruso, R., Stolfi, C., Sarra, M., Cupi, M.L. (2013). High expression of the ‘‘A Disintegrin And Metalloprotease’’ 19 (ADAM19), a sheddase for TNFalpha in the mucosa of patients with inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Disease*, 19: 501–511.

Gachohi, J., Skilton, R., Hansen, F., Ngumi, P., Kitala, P*,* 2012. Epidemiology of East Coast fever (Theileria parva infection) in Kenya: past, present and the future*. Parasites and Vectors,* 5, 194.

Galley, Y., Hagens, G., Glaser, I., Davis, W., Eichhorn, M. (1997). Jun NH2- terminal kinase is constitutively activated in T cells transformed by the intracellular parasite *Theileria parva.* *The Proceedings of the National Academy of Sciences,* U S A 94: 5119–5124.

Gallinari, P., Marco, S. D., Jones, P., Pallaoro, M., Steinkühler, C. (2007). HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research*, 17, 195–211. doi: 10.1038/sj.cr.731 0149

Gattei, V., Bulian, P., Del Principe, M.I., Zucchetto, A., Maurillo, L., Buccisano, F. (2008). Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 111: 865–873.

Gautam, O.P., Dhar, S. (1983). Bovine tropical theileriosis, a review. 1. Prevalence, transmission and symptom. *Tropical Veterinary Animal Science Research*, 1: 1–18.

Georges, K., Loria, G.R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F., Sparagano, O. (2001). Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Veterinary Parasitology*, 99: 273-286.

Gharbi, M., Darghouth, M.A. (2015). Control of tropical theileriosis (Theileria annulata infection in cattle) in North Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(7):505-10.

Glass, E.J., Preston, PM., Springbett, A., Craigmile, S., Kirvar, E., Wilkie, G., Brown, CG. (2005). *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with Theileria annulata and produce markedly different levels of acute phase proteins. *The International Journal for Parasitology*, 35: 337-347.

Glass, J.G., Crutchley, S., Jensen, K. (2012). Living with the enemy or uninvited guests: Functional genomics approaches to investigating host resistance or tolerance traits to a protozoan parasite, *Theileria annulata*, in cattle”, *Veterinary Immunology Immunopathology*, 148, 178-189.

Göksu, K. (1970). Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonlan (Piroplasmosis, habcsiosis, theileriosis) ve anaplasmosis'in yayılışı durumlan. *Türkiye Veteriner Hekimler Derneği Dergisi,* 40 (4) 29-39.

Göksu, K. Theileriosisin klinik sendromlarıyla ilgili gelişmeler. Sayın, F. (Ed), “Theileriosis*”*, İzmir: Bilgehan Basımevi; 1985; p: 97-109.

Gross, J., Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 48, 1014–1022.

Gubbels, J.M., De Vos, A.P., van der, W.M., Viseras, J., Schouls, L.M., de Vries, E., Jongejan, F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1782-1789.

Gubbels, M.J., Hong, Y., Van der Weide, M., Nijman, I.J., Guangyuan, L., Jongejan, F. (2000). Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *International Journal for* *Parasitology*, 30: 943-952.

Gubbels, M.J., Hong, Y., Van der Weide, M., Nijman, I.J., Guangyuan, L., Jongejan, F. (2000). Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *International Journal for Parasitology*, 30: 943-952.

Gul, N., Ayaz, S., Gul, I., Adnan, M., Shams, S., Gul, A.N. (2015). Tropical theileriosis and East coast fever in cattle: Present, past and future perspective. *International Journal of Current Microbiology* *and Applied Sci*ence, *4*(8), 1000-1018.

Guo, C., Davis, A.T., Yu, S. (1999). Role of protein kinase CK2 in phosphorylation nucleosomal proteins in relation to transcriptional activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 191: 135-142.

Gül, Y. (2012). *Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları* (Sığır, Koyun-Keçi). 3. Baskı. Malatya: Medipres; p.338.

Haghparast, A., Kharan, M.H., Malvandi, M.A. (2010 August 16-20). *Differential expression of pattern recognition receptors in Theileria annulata schizont infected cell lines.* Nineth International Veterinary Immunology Symposium, Edogawa-ku-Tokyo.

Hagiwara, K., Ichikawa, T., Takahashi, M. (1996). Studies on an experimental system for the invasion of *Theileria sergenti* merozoite into erythrocytes. *Veterinary Parasitology* 63:187-193.

Hall, R. (1988). Antigens and immunity in *Theileria annulata*. *Parasitology Today*, 4: 257-261.

Hall, R., Hunt, P.D., Carrington, M., Simmons, D., Williamson, S., Mecham, R.P., Tait, A. (1992). Mimicry of elastin repetitive motifs by *Theileria annulata* sporozoite surface antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 53: 105-112.

Hall, R., Ilhan, T., Kirvar, E., Wilkie, G., Preston, P.M. (1999). Mechanism(s) of attenuation of *Theileria annulata* vaccine cell lines. *Tropical Medicine & International Health* 4: A78–84.

Hashemi-Fesharki, R. (1988). Control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasitology Today*, 4:36-40.

Hassan, A.H., Salmo, N.A., Jabbar, A. S. (2012). Pathological and molecular diagnostic study of theileriosis in cattle in Sulaimaniyah Province, Iraq. *Proceeding of the Eleventh Veterinary Scientific* *Conference*, 11: 306–314.

Heussler, V.T. (2002). *Theileria* survival strategies and host cell transformation. In: Dobbelaere, D., Mckeever, D. (Eds.) World Class Parasites 3 *Theileria*. Boston/ Dordrecht/ London. Kluwer Academic Publishers,

Hooshmand-Rad, P. (1976). The pathogenesis of anaemia in *Theileria annulata* infection. *Research in Veterinary Science*, 20: 324-329.

Howard, A., Baylis, A.M., Roger, H. (1995). Infection with *Theileria annulata* induces expression of matrix metalloproteinase 9 and transcription factor AP-1 in bovine leucocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology,* 69: (2); 211-22.

Hudson, A.T., Randall, A.W., Fry, M., Ginger, C.D., Hill, B., Latter, V.S., McHardy, N., Williams, R.B. (1985). Novel anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. *Parasitology*, 90 (1): 45-55.

Ilhan, T. (1995). *Theileria annulata*: immunity and carrier state, Master Tezi. The University of Edinburgh. Edinburgh.

Ilhan, T., Williamson, S., Kirvar, E., Shiels, B., Brown, C.G. (1998). *Theileria annulata*: carrier state and immunity. *Annals of NewYork Academy of Science*, 849: 109-125.

İmren, H.Y. ve Şahal, M. (1991). *Veteriner İç Hastalıkları*. İmren HY, editör. 2. Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi; p.162-3.

Jensen, K., Paxton, E., Waddington, D., Talbot, R., Darghouth, M.A., Glass, E.J. (2007). Differences in the transcriptional responses induced by *Theileria* *annulata* infection in bovine monocytes derived from resistant and susceptible cattle breeds. *The International Journal for Parasitology*, 38: 313-25.

Jin, C., Xu, Y.T., Zhang, S.F., Lu, C., Yu, L.Z. (2007). Cloning and sequence analysis of the cattle *Theileria sergenti* P33 surface protein gene. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,* 29: 112–119.

Jones, B.W., Heldwein, K.A., Means, T.K., Saukkonen, J.J., Fenton, M.J. (2001). Differential roles of toll like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 60: 6-12.

Kachani, M., Flach, H., Williamson, S., Mcdonald, F., Shiels, B., Spooner, R.L., Ouhelli, H. (1994). *The use of ELISA in theileriosis studies in Morocco* [European Unıon Third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis], Antalya, Turkey.

Kahn, C.M., Line, S.M. (2010). *Veterinary Manual*. 10. baskı. New Jersey, A.B.D.: Merck and Co. Inc. p.33-5.

Karaer, Z. (1985). Theileriosisin bulaşması ile ilgili gelişmeler. In: Sayın, F. (Ed), *Theileriosis*. İzmir: Bilgehan Basımevi; 1985; p: 47-76.

Karaer, Z. (1985). Theileriosisin bulaşması ile ilgili gelişmeler. In: Sayın, F. (Eds.), *Theileriosis*. İzmir: Bilgehan Basımevi, p: 47-76.

Kasuga, I., Hogg, J.C., Pare, P.D., Hayashi, S., Sedgwick, E.G. (2009). Role ofgenetic susceptibility to latent adenoviral infection and decreased lung function. *Respiratory Medicine*, 103: 1672–1680.

Kemeny, D.M., Chantler, S. (1988). An introduction to ELISA. In ELISA and other solid Phase Immunoassays. Kemeny, D.M., Challacombe, S.J. (Ed), *Theoretical and Practical Aspects*. John Wiley and Son Ltd: Chichester; 1-30.

Kiltz, H.H., Uilenberg, G., Franssen, F.F., Perie, N.M. (1986). *Theileria orientalis* occurs in Central Africa. *Research in Veterinary Science*, 40: 197–200.

Kim, M., Ogawa, M., Fujita, Y., Yoshikawa, Y., Nagai, T. (2009). Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. *Nature* 459:578-U109.

Kirvar, E., Ilhan, T., Katzer, F., Hooshmand-Rad, P., Zweygarth, E., Gerstenberg C, … Brown, C.G. (2000). Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. *Parasitology*,120 (Pt 3): 245-254.

Kocan, K.M., Edmour, F., Blouın, E.F., Barbet, AF. (2000). *Anaplasmosis* control past, present, and future. *Annals of New York Academy of Sciences*, 916:501-9.

Korn, E.D., Remy, C.N., Wasileyko, H.C., Buchanan, J.M. (1955). Biosynthesis of nucleotides from bases by partially purified enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 217:875-83.

Kornberg, A., Lieberman, I., Sims, E. S. (1955). Enzymatic synthesis of purine nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, 215:417- 27

Köse, O., Bilgiç, H.B., Bakırcı, S., Karagenç, T., Adanır, R., Yukarı, B.A., Eren, H. (2021). Prevalence of *Theileria*/*Babesia* species in ruminants in Burdur province of Turkey. *Acta Parasitologica.* <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00515-z>

Lawrence, J.A. (1997). Conventional vaccines for tick-borne haemoparasitic diseases of sheep and goats. *Parassitologia,* 39: 119-121.

Lawrence, J.A., De Vos, A.J., Irvin, A.D. (1994). *Theileriosis*. In: Coetzer, J.A.W., Thomson, G.R., Tustin, R.C. (Ed), Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa. Oxford University: Cape Down, Chapter 26.

Leemans, I., Brown, D., Fossum, C., Hooshmand-Rad, P., Kirvar, E., Wilkie, G., Uggla, A. (1999a). *Infectivity and cross-immunity studies of Theileria lestoquardi* *and Theileria annulata* *in sheep and cattle: II. In vitro studies*. *Veterinary Parasitology*, 82: 193-204.

Leemans, I., Brown, D., Hooshmand-Rad, P., Kirvar, E., Uggla, A. (1999b). *Infectivity and cross-immunity studies of Theileria lestoquardi* *and Theileria annulata* *in sheep and cattle: I. In vivo responses*. *Veterinary Parasitology*, 82: 179-192.

Levine, N.O. (1988). The protozoan phylum Apicomplexa. *CRC pres*s, Boca Raton, Florida, USA. Vol. I and II. Li, Y., and Seto, E. (2016). HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. Doi: 10.1101/ cshperspect. a026831.

Lizunda, R., Chaussepied, M., Huerre, M., Werling, D., Santo, J.P.D., Langsley, G. (2006). c-jun NH2 terminal kinase/c-jun signaling promotes survival and metastasis of B lymphocytes transformed by *Theileria. Cancer Research,* 66(12): 6105-10.

Lizundia, R., Chaussepied, M., Huerre, M., Werling, D., Di Santo, J.P. (2006). c- Jun NH2 terminal kinase/c-Jun signaling promotes survival and metastasis of B lymphocytes transformed by *Theileria*. *Cancer Research*, 66: 6105–6110.

Lizundia, R., Chaussepied, M., Naissant, B., Masse, G.X., Quevillon, E. (2007). The JNK/AP-1 pathway upregulates expression of the recycling endosome rab11a gene in B cells transformed by *Theileria*. *Cell Microbiology,* 9: 1936–1945.

Lizundia, R., Sengmanivong, L., Guergnon, J., Muller, T., Schnelle, T. (2005). Use of micro-rotation imaging to study JNK-mediated cell survival in *Theileria parva*-infected B-lymphocytes. *Parasitology,* 130: 629–635.

Mans, B. J., Pienaar, R., & Latif, A. A. (2015). A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(1), 104- 118.

Martin-Sanchez, J., Viseras, J., Adroher, F.J., Garcia-Fernandez, P. (1999). Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies. *Parasitology Research*, 85: 243-245.

Mc Hardy, N., Wekesa, L.S., Hudson, A.T., Randall, A.W. (1987). Buparvaquone (BW 720C) a patent new anti-theilerial compound, Proceedings of the inaugural symposium of the Indian association for the advencement of Veterinary parasitology, 12-13 February, p: 29, Izatnagar, Indian.

McKeever, D.J. (2009). Bovine immunity a driver for diversity in *Theileria* parasites? *Trends Parasitology.* 25, 269–276.

Meggio, F., Pinna, L.A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB Journal*, 17:349-368.

Mehlhorn, H. (2001). *Encyclopedic reference of parasitology, Disease Treatment, Therapy*, 2nd Edition. Newyork: *Springer-Verlag Berlin Heidelberg Berlin*, 567.

Mehlhorn, H., Shein, E. (1984). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology,* 23: 37-103.

Memmo, L.M., McKeown-Longo, P. (1998). The alpha v beta 5 integrin functionsas an endocytic receptor for vitronectin. *Journal Cell Science*, 111: 425–433.

Metheni, M., Echebli, N., Chaussepied, M., Ransy, C., Chereau, C. (2014). The level of H2 O2 type oxidative stress regulates virulence of *Theileria*-transformed leukocytes. *Cellular Microbiology*,16:269–279.

Mhadhbi, M., Naouach, A., Boumiza, A., Chaobani, M.F., Ben Abderazzak, S., Darghouth, M.A. (2010). In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone. *Veterinary Parasitology*, 169: 241-247.

Mimioglu, M., Ulutas, M., Güler, S. (1971). Yurdumuz Sığırlarında Theileriosis Etkenleri ve Diğer Kan Parazitleri. *Ankara: Ajans-Türk Matbaacilik Sanayii.*

Mimioğlu, M. (1955). Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde ‘’haematuria vesicalis bovisli’’ sığırlarda parazitolojik araştırmalar*. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 2: 183-192.

Mochizuki, S., Okada Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Science*, 98: 621–628).

Mohamed, A.M., Abdel-Rady, A., Ahmed, L.S., El-Hosary, A. (2012). Evaluation of indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of tropical theileriosis in cattle (*Bos* *indicus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Veterinary Parasitolology*, 186 (3-4): 486 9.

Molad, T., Mazuz, M.L., Fleiderovitz, L., Fish, L., Savitsky, I., Krigel, Y., … Shkap, V. (2006). Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. *Veterinay Microbiology*, 113; 55- 62.

Morrison, W.I. (2015). The aetiology, pathogenesis and control of theileriosis in domestic animals. *Revue Scientifique et Technique*.34(2):599-611.

Mousa, S.A., Lorelli, W., Campochiaro, P.A. (1999.) Role of hypoxia andextracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growthfactors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* ,74:135–143

Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16: 223–229.

Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T., Notomi, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template*. Clinical Chemistry*, 47:1742-1743.

Neitz, W.O. (1957). Theileriosis, gonderioses and cytauxzoonoses, a review, onderstepoort. *Journal of Veterinary Science*, 27: 275-381.

Nguyen, K.V., Naviaux, R.K., Paik, K.K., Nyhan, W.L. (2011). Novel mutations in the human HPRT gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 30(6):440–5.

Norvall, R.A.I., Perry, B.D., Young, A.S. (1992). *The Epidemiology of Theileriosis in Africa*. London: *Academic Press*, 481.

Onar, E. (1989). Türkiye'de Tropical Theileriosis’e (*Theileria annulata*) karşı aşı hazırlama ve uygulama çalışmaları. Demirözü, K., Uysal, Y., Nadas, Ü.G., Türkaslan, J., Altınel, C., Alp, H. (Ed). Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu. *Pendik Hayvan Hastalıkları Merkezi Arastırma Enstitüsü Yayınları*, 10: 47-52.

Ouhelli, H., Innes, E.A., Brown, C.G., Walker, A.R., Simpson, S.P., Spooner, R.L. (1989). The effect of dose and line on immunisation of cattle with lymphoblastoid cells infected with *Theileria* *annulata*. *Veterinary Parasitology*, 31 (3-4): 217-228.

Özcan, H.C. (1961). Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen piroplosmose vakaları ve tedavileri üzerine araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, 143, Çalışmalar: 83, Ankara, 106 s.

Pekel, G. (2014). *Aydın, İzmir, Manisa illerindeki sığırlarda theileria ve babesia türlerinin reverse line blot hibridizasyon tekniği ile belirlenmesi.* Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Aydın.

Pflum, M.K., Tong, J.K., Lane, W.S. (2001). Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276:47733-47741.

Pieszko, M. (2015). *Molecular regulation of the macroschizont to merozoite differentiation in Theileria annulata.* PhD Thesis, University of Glasgow, UK. pp: 308.

Pipano, E. (1965). Piroplasmosis, A rewiew. *Harefuah,* 22: 181-175.

Pipano, E. (1976). C*ontrol* of bovine theileriosis and anaplasmosis in Israel. *Bulletin de l'Office International des Epizooties,* 86: 55-59.

Pipano, E. (1989a). Bovine theileriosis in Israel. *Bulletin-Office International des épizooties,*  8: 79-87.

Pipano, E. (1989b). Vaccination against *Theileria annulata* theileriosis. In: Wright, I.G. (Eds.), *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, p: 203-234.

Pipano, E. (1994). *Theileria annulata* theileriosis. Coetzer, J.A.W., Thomson, G.R., Tustin, R.C., Kriek, P.J. (Ed), *Infectious Diseases of Livestock With Special Reference to Sount Africa*. *Oxford University Press*, p: 341-348.

Pipano, E., Shkap, V., Coetzer, J.A.W., Tustin, R.C. (2006). *Theileria annulata* infection, in *Infectious Diseases of Livestock*. *Oxford University Press*, 486-497.

Preston, .PM., Brown, C.G., Bell-Sakyi, L., Richardson, W., Sanderson, A. (1992). Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*. *Research in Veterinary Science*, 53;230- 243.

Preston, P.M., Brown, C.G. (1985*).* Inhibition of lymphocyte invasion by sporozoites and the transformation of trophozoite infected lymphocytes in vitro by serum from *Theileria annulata* immune cattle. *Parasite Immunology*, 7: 301-314.

Preston, P.M., Jongejan, F. (1999). Protective Immune Mechanisms to Ticks and Tickborne Diseases of Ruminants. *Parasitology Today*, 15(7).

Purnell, R.E. (1978). Theileria annulata *as a hazard to cattle in countries in the northern Mediterranean littoral*. *Veterinary Sciences Communications*, 2: 3-10.

Renneker, S., Abdo, J., Ahmed, J.S., Seitzer, U. (2009). Field validation of a competitive ELISA for detection of *Theileria annulata* infection. *Parasitology Research*, 106 (1): 47-53.

Rundhaug, J.E. (2003). Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart et al., Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clinical Cancer Research*, 9: 00–00, 2003.

Salih, D.A., Liu, Z., Bakheit, M.A., Ali, A.M., El Hussein, A.M., Unger, H., … Ahmed, J.S. (2008). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of tropical theileriosis. *Transboundary and Emerging* *Diseases*, 55: 238–243.

Samish, M. ve Pipono, E. (1978). Development of infectivity in *Hyalomma detritum* (Schulze, 1904) tick infected with *Theileria annulata* (Dschunkowzky and Luhs, 1904) *Parasitology,* 77, pp. 375-379.

Samish, M., Pipano, E. (1976). Transmission of *Theileria annulata* by two and three host ticks of genus *Hyalomma* (*Ixodidae*). (Proceedings of International Conference). Tick-Born Diseases and Their Vectors. Edinburg, 371-372.

Sangwan, A.K., Chhabra, B.M., Samantaray, S. (1989). Relative role of male and female Hyalomma anatolicum ticks in Theileria transmission. Veterinary Parasitology, 3, pp. 83-87.

Sayın, F., Dincer, S., Cakmak, A., Inci, A., Yukarı, B.A., … S., Deniz, A. (1997). Tick-borne diseases in Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 29: 53-57.

Sayın, F., Dinçer, S., Karaer, Z., Çakmak, A., Inci, A., Yukarı, B.A., Eren, H. (1999). Ankara Yöresinden Elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky ve Luhs, 1904) İzolatları Üzerinde Araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46 (2-3): 207 218.

Sayın, F., Dinçer, S., Karaer, Z., Çakmak, A., Inci, A., Yukarı, B.A., … Vatansever, Z. (2000). Türkiye'de Tropikal theileriosis Üzerine Araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 47 (1): 1- 11.

Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., Eren, H. (1999). Ankara yöresinde elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) izolatları üzerinde araştırmalar. 5. *Theileria annulata* kan stabilatları ile enfekte edilen danalar üzerinde antikor yanıtı ve serolojik çapraz reaksiyon çalışmaları*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46(2-3): 207-18.

Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., … Vatansever, Z. (2000). Türkiye'de tropikal theileriosis üzerinde araştırmalar. 2. *Theileria annulata*'nın değişik yöntemlerle kültivasyonu ve izolasyonu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 47 (2): 157-66.

Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., Nalbantoğlu, S., Vatansever, Z., …, Melrose, R. (2001). Türkiye'de tropikal theileriosis üzerinde araştırmalar. 3. *Theileria annulata* ile deneysel olarak enfekte edilmiş buzağılar üzerinde beslenen 4. *Hyalomma* (Ixodidae) türünün enfeksiyon oranları üzerinde karşılaştırmalı çalışmalar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 25(3): 258-64.

Sayın, F., Karaer, Z., Dincer, S., Cakmak, A., Inci, A., Yukarı, B. A., Melrose, T.R. (2003). A comparison of susceptibilities to infection of four species of *Hyalomma* ticks with *Theileria annulata. Veterinary Parasitology*, 113: 115–121.

Sayin, F., Dincer, S., Karaer, Z., Cakmak, A., Inci, A., Yukari, B.A., Eren, H, … Nalbantoglu, S. (2003). Studies on the epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in cattle in Central Anatolia Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 35: 521-539.

Schein, E., Büscher, G., Friedhoff, K.T. (1975). Lichtmikroscopische untersuchungen uber die entwicklung von *Theileria annulata* (Dshunkowsky und Luhs, 1904) in *Hyalomma* *anatolicum exavatum* (Koch,1844). I. Die Entwicklung im Darm Volge Sogener Nymphen Zeitschrift für Parasitenkunde, 48: 123-136.

Schlomann, U., Wildeboer, D., Webster, A. (2002). The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 48 210–19.

Schneider, I., Haller, D., Kullmann, B., Beyer, D., Ahmed, J.S., Seitzer, U. (2007). Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitology Research*, 101: 1471-1482.

Schnittger, L., Katzer, F., Biermann, R., Shayan, P., Boguslawski, K., McKellar, S., … Ahmed, J.S. (2002). Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests andsubunit vaccines. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120: 247-256.

Schnittger, L., Shayan, P., Biermann, R., Mehlhorn, H., Gerdes, J., Ahmed, J.S. (2000). Molecular genetic characterization and subcellular localization of *Theileria annulata* mitochondrial heatshock protein 70. Parasitology Research, 86: 444–452.

Sergent, E., Donatien, A.L., Parrot, L.M., Lestoquard, F. (1945). Etudes sur les pirolasmoses bovines*. Institude Pasteur d'Algeria*: Alger.

Shah-Fischer, M., Say, R.R. (1989). Manual of tropical veterinary parasitology. Wallingford, United Kingdom; *Centre for Agriculture and Bioscience International*.

Shanafelt, T.D., Geyer, S.M., Bone, N.D., Tschumper, R.C., Witzig, T.E., Nowakowski, G.S. (2008). CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *British Journal of Haematology*, 140: 537–546.

Sharifiyazdi, H., Namazi, F., Oryan, A., Shahriari, R., Razavi, M. (2012*). Point mutations in the Theileria annulata* cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure. *Veterinary Parasitology,* 187: 431–435.

Shaw, M.K. (1997). The same, but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells. *The International Journal for Parasitology*, 27: 457–474.

Shaw, M.K. (2002) *Theileria* development and host cell invasion. In: Dobbelaere, D.A.E., McKeever, D.J. (Ed), World Class Parasites (3), *Theileria*. London: Kluwer Academic Publishers; 1-23, Boston, London, UK

Shaw, M.K. (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends in Parasitology*, 19(1): 2– 6.

Shaw, M.K., Tilney, L.G., Musoke, A.J. (1991). The entry of *Theileria parva* sporozoites into bovine lymphocytes: evidence for MHC class I involvement. *Journal of Cell Biology*, 113(1): 87-101.

Shayan, P., Biermann, R., Schein, E., Gerdes, J., Ahmed, J.S. (1998). Detection and differentiation of *Theileria annulata* and *Theileria parva u*sing macroschizont-derived DNA probes.  *Annals of the New York Academy of Sciences*, 849: 88–95.

Shiels, B., Langsley, G., Weir, W., Pain, A., McKellar, S.D. (2006). Alternation of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *T. parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. *The International Journal for Parasitology*, 36: 9-21.

Shiels, B.R., d'Oliveira, C., McKellar, S., Ben Miled, L., Kawazu, S., Hide, G. (1995). Selection of diversity at putative glycosylation sites in the immunodominant merozoite/piroplasm surface antigen of *Theileria* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 72: 149-162.

Singh, B., Su, Y.C., Riesbeck, K. (2010). Vitronectin in bacterial pathogenesis: a hostprotein used in complement escape and cellular invasion. *Molecular Microbiology*, 78:545–560.

Singh, D.K., Thakur, M., Raghav, P.R.S., Varshney, B.C. (1993). Chemotherapeutic trials with four drugs in crossbred calves experimentally infected with *Theileria annulata*. *Research in Veterinary Science,* 54: 68-71.

Somerville, R.P., Littlebury, P., Pipano, E., Brown, C.G., Shkap, V., Adamson, R.E., Oliver, R.A., Glass, E.J., & Hall, F.R. (1998). Phenotypic and genotypic alterations associated with the attenuation of a *Theileria annulata* vaccine cell line from Turkey. *Vaccine*, 16, 569-575.

Somerville, R.P.T., Adamson, R.E., Brown, C.G.D., Hall, F.R. (1998). Metastasis of *Theileria annulata* macroschizont-infected cells in scid mice is mediated by matrix metallopreteinases. *Parasitology*, 116:223-28.

Soulsby, J.L. (1986). Helmints, arthropods and protozoa of domesticated animals. Bailliere Tindal, London: 7th Edition.

Spickler, A. R. (2010). *Emerging and exotic diseases of animals*, 4th ed CFSPH Iowa State University, lowa USA pp. 283-285.

Stewart, N.P., Vilenberg, G., De Vos, A.J. (1996). Review of Australian species of *Theileria*, with special reference to *Theileria buffeli* of cattle. *Tropical Animal Health and Production,* 28: 81-90.

Sugimoto, C., Fujisaki, K. (2002). Non-transforming Theileria parasites of ruminants. In: Dirk, A.E., Dobbelaere, D.A.E., McKeever, D.J. (Ed), *Word Class Parasites*, Kluwer Academic Publishers, pp: 93-106, Boston, Dordrecht, London.

Taha, E.M., Mahmoud, A.A., Abd El-Rahman, A.H., Fadly, R.S. (2018). Epidemiological, clinical and diagnostic studies on blood parasites in cattle and buffaloes in ElBehera provence. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 56(1):45-55.

Tarimo, M. A. (2013). Studies on the prevalance of east coast fever among cattle in Kilosa district. Master Thesis. Sokoine, University of Agriculture. Morogoro, Tanzania. Pp:63.

Tüzer, E. (1981). Istanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen Babesio, Theileria ve Anaplasma türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonlann yayılışı üzerine araştırma*. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8 (1)97-110.

Uilenberg, G. (1981a). Theilerial species of domestic livestock, In: Irvin, A.D., Cunningham, M.P., Young, A.S (Eds.). *Advances in the Control of Theileriosis*. Martinus Nijhoff Publisher, The Hague, p 4-37. Boston, London.

Uilenberg, G. (1981b). *Theileria* infection other than East Coast Fever. In: Ristic, M., Intyr, I.M. (Eds.), *Disease of cattle in the tropics*. Martinus Nijhoff Publisher, The Hague, p: 411-427.

Unger, G.M., Davis, A.T., Slaton, J.W. (2004). Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 4:77-84

Vatansever, Z., Nalbantoglu, S. (2002). Detection of cattle infected with *Theileria annulata* in fields by nested PCR, IFAT and microscopic examination of blood smears. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,* 26: 1465-1469.

Ververken, C., Geysen, D., Loots, K., Janssens, E.M., Guisez, Y., Goddeeris, B.M. (2008). Orientation of bovine CTL response toward PIM, an antibody -inducing surface molecule of *Theilera parva* by DNA subunit immunization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*,124: 253-63.

Vincent, A.M., Cawley, J.C., Burthem, J. (1996). Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 87: 4780–4788.

Williamson, S., Tait, A., Brown, D., Walker, A., Beck, P., Shiels, B., … Hall, R. (1989). *Theileria annulata* sporozoite surface antigen expressed in *Escherichia coli* elicits neutralizingantibody. *Proceedings of National Academy of Science* *USA*,86: 4639-4643.

Wilson, S.M. (1991). Nucleic-acid techniques and the detection of parasitic diseases. *Parasitology Today*, 7: 255-259.

Wu, J., Bond, C., Chen, P., Chen, M., Li, Y., Shohet, R.V., Wright, G. (2015). HIF-1α in the heart: Remodeling nucleotide metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 82: 194–200. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.014

Young, A.S., Dolan, T.T., Morzaria, S.P., Mwakima, F.N., Norval, R.A.I., Scott, J.S., … Gettinby, G. (1996). Factors influencing infections in *Rhipicephalus appendiculatus* ticks fed on cattle infected with *Theileria parva*. *Parasitology,* 113: 255–266.

Yukarı, B.A. (1993). Laboratuvarda *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch,1844) kolonisinin elde edilmesi ve muhafazası. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 40 (1): 99- 114.

Zhang, X., Ozawa, Y., Lee, H. (2005). Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes & Development*, 19:827-839.

Zheng, Y., Saftig, P., Hartmann, D., Blobel, C. (2004). Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). *Journal of Biological Chemistry* ,279: 42898–42906.

Zhou, M., Cao, S., Sevinc, F., Sevinc, M., Ceylan, O., Moumouni, P.F.A., … Xuan, X. (2016). Molecular detection and genetic identification of *Babesia bigemina, Theileria annulata, Theileria orientalis* and *Anaplasma marginale* in Turkey. *Ticks Tick Borne Disease*, 7(1):126-134. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.09.008.

Zohren, F., Toutzaris, D., Klarner, V., Hartung, H.P., Kieseier, B., Haas, R. (2008). The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34 þ hematopoietic progenitor cells in humans. *Blood*, 111: 3893–3895.

**8. BİLİMSEL ETİK BEYANI**

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“*Theileria annulata*’nın hücre kültürü pasajlarında atenüasyon düzeylerinin moleküler belirteçler ile incelenmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezimdeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Beril KOÇ

… / … / …

**9. ÖZ GEÇMİŞ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Soyadı, Adı** | **: KOÇ BERİL** |
| **Uyruk** | **:** **TR** |
| **Doğum Yeri ve Tarihi** | **: Aydın** |
| **E-mail** | **: berillkocc54@gmail.com** |
| **Yabancı Dil** | **: İngilizce** |

**EĞİTİM**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Derece** | **Kurum** | **Mezuniyet tarihi** |
| Lisans | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | 11.06.2018 |

**İŞ DENEYİMİ**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Yıl** |  |  | **Yer/Kurum** | **Ünvan** |
| 06.2018/08.2019 |  |  | Veteriner Kliniği (özel) | Veteriner Hekim |

**AKADEMİK YAYINLAR**

1. **MAKALELER**
2. **PROJELER**
3. **BİLDİRİLER**
4. **Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler**
5. **Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler**
6. **Beril KOÇ**, Tülin KARAGENÇ, Selin HACILARLIOĞLU, Hakan KANLIOĞLU, Heycan Berk AYDIN1,2, Metin PEKAĞIRBAŞ, Serkan BAKIRCI, Hüseyin Bilgin BİLGİÇ **(2021) ‘***Theileria annulata*’nın hücre kültürü pasajlarında atenüasyon düzeylerinin farklı markerlar ile incelenmesi’. 22. Parazitoloji Kongresi, 11 – 15 Ekim 2021, Didim, Aydın (http://turkiyeparazitolojidernegi.org/wp/wp-content/uploads/2021/10/UPK22\_OZET\_KITABI.pdf). (**Özet Bildiri/Sözlü Sunum**).