



**T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HEPATİT B AÇISINDAN POTANSİYEL
REZERVUAR KONAK OLAN TIBBİ SÜLÜKLERİN
TRANSOVARYAL NAKİLDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Nadia Ibrahim Kamil KAMIL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2025



**T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HEPATİT B AÇISINDAN POTANSİYEL
REZERVUAR KONAK OLAN TIBBİ SÜLÜKLERİN
TRANSOVARYAL NAKİLDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Nadia Ibrahim Kamil KAMIL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Alican BİLDEN**

KIRŞEHİR - HAZİRAN/2025

KABUL VE ONAY

“Hepatit B Açısından Potansiyel Rezervuar Konak Olan Tıbbi Sülüklerin Transovaryal Nakildeki Rolünün Araştırılması” başlıklı bu çalışma, 04.06.2025 tarihinde aşağıda isimleri belirtilen jüri üyeleri tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Alican BİLDEN (Danışman)
Kırşehir Ahi Evran Üniversssitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi ÖNDER AKKAŞ
Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Tıp Fakültesi

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bu çalışma Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminin TIP.A4.24.004 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Nadia Ibrahim Kamil KAMIL

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başlama sürecimden itibaren tanıma fırsatı bulduğum günden bu yana, sakinliği ve sabrıyla her zaman bana örnek olan, bir bilim insanının nasıl çalışması gerektiğini bizzat ondan öğrendiğim çok kıymetli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Alican BİLDEN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında, hem yönelttiğim sorulara verdikleri açıklayıcı cevaplarla hem de altı ayda bir gerçekleştirilen tez izleme komitesi sunumlarında verdikleri yapıcı katkılarla çalışmamın şekillenmesine ve nihai hâlini almasına büyük destek veren değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK ve Dr. Öğr. Üyesi Önder AKKAŞ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tezi yazma sürecimde, yönelttiğim sorulara sabırla yanıt vererek bana destek olan Arş. Gör. Merve KAHRAMAN'a da ayrıca teşekkür ederim.

Bu tezi başta sevgili annem ve babam olmak üzere, her daim yanımda olan kardeşlerim Mohammed ve Abdulrahman'a ithaf ediyorum.

Ve elbette, bu yolculuk boyunca sessizce yanımda yer alan, varlıklarıyla huzur veren, miyavlarıyla günümü güzelleştiren canım kedilerime sonsuz teşekkürler...

Haziran, 2025

Nadia Ibrahim Kamil KAMIL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç	2
1.2. Önemi	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sülüklerin Tarihçesi	4
2.2. Sülüklerin Anatomisi	8
2.2.1. Sülüklerin Sınıflandırılması ve Çeşitleri	9
2.2.2. <i>Hirudo verbana</i>	11
2.3. Sülük Yetiştiriciliği	12
2.3.1. Kapalı Ortam Sülük Yetiştiriciliği	12
2.3.1.1. Tank Modeli	12
2.3.1.2. Kavanoz/Raf Modeli	13
2.3.2. Açık Ortam Sülük Yetiştiriciliği.....	14
2.3.2.1. Havuz Modeli	14
2.4. Hirudoterapi Uygulamaları	16
2.4.1. Plastik Cerrahi ve Ortopedik Uygulamalarda Hirudoterapi ..	17
2.4.2. Yara ve Ağrı Tedavisinde Hirudoterapi	17
2.4.3. Hirudoterapinin Ağız ve Diş Sağlığındaki Önemi.....	18
2.5. Hepatit B Virüsü	19
2.6. Transovaryal Geçiş (Bulaş).....	21

2.6.1. Transovaryal Geçiş ile Bulaşan Patojenler	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Besleme Kanının Temini.....	24
3.2. Sülüklerin Temini ve Beslenmesi	24
3.3. Deney Düzenegiinin Kurulması ve Numunelerin Toplanması	28
3.4. Kimyasal Malzemeler	31
3.5. Cihazlar ve Diğeri Malzemeler	33
3.6. DNA İzolasyonu ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR.....	35
3.6.1. PowerSoil DNA İzolasyon Kiti	35
3.6.2. DNeasy Blood & Tissue Kit	37
3.6.3. DNA İzolasyon Saflığı	39
3.6.4. Ters Transkripsiyon Kuantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) .	40
4. BULGULAR	42
5. TARTIşMA VE SONUÇ	46
KAYNAKLAR.....	54
EKLER	63
EK-1: Etik Kurul İzni.....	63
EK-2: Tezden Üretilen Makaleler ve Bildiriler	64
ÖZGEÇMİş	65

SEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Eski Yunan döneminde sülüklerin kullanımını gösteren çizimli kavanoz	4
Şekil 2.2: Tarihsel süreçte sülük toplama, saklama ve uygulama yöntemlerine ait araç-gereçler	5
Şekil 2.3: 1985 yılında iyileşme sürecini hızlandırmak için kulak greftine sülük uygulanması	6
Şekil 2.4: Sülüğün anatomisi	8
Şekil 2.5: <i>Hirudo verbana</i> ’nın morfolojik yapısı ve üreme sistemine ait anatomik özellikleri.....	11
Şekil 2.6: Tank modeli	13
Şekil 2.7: Raf modeli	14
Şekil 2.8: Havuz modeli.....	15
Şekil 2.9: Mikrovasküler serbest flepte gelişen venöz konjesyonun sülük tedavisi ile klinik seyri.....	17
Şekil 2.10: Migren ve diyabetik ayak ülserlerinde sülük tedavisi uygulamaları	18
Şekil 2.11: Diş ve diş eti problemlerinin tedavisinde sülüklerin kullanımı	19
Şekil 2.12: Hepatit B virüsünün yapısı	20
Şekil 2.13: <i>Babesia</i> spp. sensu stricto'nun yaşam döngüsü.....	23
Şekil 3.1: Besleme kanının hazırlanması	25
Şekil 3.2: Sülüklerin Hepatit B ile kontamine kan ile beslenmesi	27
Şekil 3.3: Anaç sülüklerin ağırlık değişimleri.....	27

Şekil 3.4: Sülüklerin kontrollü koşullarda barındırıldığı deneysel habitat	28
Şekil 3.5: Anaç sülüklerden toplanan kokonlar	29
Şekil 3.6: Süre bitiminden sonra kokonların manuel açılması.....	30
Şekil 3.7: Kontaminasyonu önlemek amacıyla yavru ve anaç sülüklerin ayrı kaplarda tutulması	30
Şekil 3.8: PowerSoil Kiti ile toprak kaynaklı DNA izolasyon protokolü	36
Şekil 3.9: DNeasy Blood & Tissue Kiti kullanılarak uygulanan DNA izolasyon prosedürü	38
Şekil 3.10: DNA jel elektroforez görüntüsü	40
Şekil 3.11: SYBR Green kullanılarak gerçek zamanlı PCR aşamalarının görselleştirilmesi	41
Şekil 4.1: Tüm örneklerin amplifikasyon eğrileri ve Ct değerleri	45

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Sülük tükürük salgısında bulunan biyoaktif maddeler	7
Tablo 2.2: Sülüklerin sınıflandırılması	10
Tablo 4.1: Kokon ve yavru sayıları	43
Tablo 4.2: Örnek tipleri ve bunlara ait HBV RT-qPCR sonuçları	44



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
L	: Litre
mL	: Mililitre
μ L	: Mikrolitre
g	: Gram
mg	: Miligram
μ g	: Mikrogram
IU/mL	: Uluslararası Birim/Mililitre
mIU/mL	: Mili-Uluslararası Birim/Mililitre
mg/L	: Miligram/Litre
μ S/cm	: Mikrosiemens/Santimetre
°C	: Santigrat Derece

Kısaltmalar	Açıklama
AMP	: Antimikrobiyal Peptitler
ASFV	: Afrika Domuz Vebası Virüsü
BVDV	: Bovine Viral Diarrhea Virus
CCF	: Söloomik Sitolitik Factor
CITES	: Nesli Tehlikede Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme
CMF	: Kozmik Mitojenik Faktör
CRPS	: Kronik Bölgesel Ağrı Sendromu
Ct	: Döngü Eşiği
dATP	: Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin Trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin Trifosfat
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit

dTTP	: Deoksitimidin Trifosfat
D.O	: Çözünmüş Oksijen
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
HBV	: Hepatit B Virüsü
HbsAg	: Hepatit B Yüzey Antijeni
HCV	: Hepatit C Virüsü
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HTLV-1	: İnsan T-Hücresi Lenfotropik Virüsü Tip 1
KKKA	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
NK	: Doğal Katil
PC	: Pozitif Kontrol Sülüğü
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
POWV	: Powassan Virüsü
PPE	: Kişisel Koruyucu Ekipmanlar
qPCR	: Kantitatif PCR
RNA	: Ribonükleik Asit
Rnase	: Ribonükleaz (RNA Parçalayan Enzim)
RT-qPCR	: Ters Transkripsiyon Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	: Sülük
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	: Tris-Asetat-EDTA (Tampon Çözeltilisi)
Taq	: Taq Polimeraz (Thermus Aquaticus)
TBEV	: Kene Kaynaklı Ensefalit Virüsü
TENS	: Transkütanöz Elektriksel Sinir Stimülasyonu
TNF	: Omurgalıların Tümör Nekroz Faktörü
VL	: Beslenme Kanının Viral Yüğü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPATİT B AÇISINDAN POTANSİYEL REZERVUAR KONAK OLAN TIBBİ SÜLÜKLERİN TRANSOVARYAL NAKİLDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Nadia Ibrahim Kamil KAMIL

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Alican BİLDEN

Sülük tedavisi, tıbbi sülüklerle uygulanan ve hirudoterapi olarak da bilinen, geleneksel tamamlayıcı tıbbın en eski ve en bilinen yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Tarih boyunca sülükler, çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın biçimde kullanılmıştır. Ancak bu yöntemin etkinliğine rağmen, en büyük endişelerden biri, patojen mikroorganizmaların bulaşma riskidir. Bu riski azaltmak amacıyla, sülüklerin genellikle kullanım sonrasında imha edilmesi tercih edilmektedir. Ancak söz konusu uygulamanın, sülük popülasyonlarının sürdürülebilirliği ve ekolojik denge üzerinde olumsuz etkiler yarattığı değerlendirilmektedir.

Bu bağlamda, yürütülen çalışmada, bulaşıcı etkenlerin, özellikle Hepatit B virüsünün (HBV), sülüklerin üreme sistemi aracılığıyla nesiller arası (dikey) olarak aktarılıp aktarılmadığı araştırılmıştır. Buna ek olarak, HBV'nin sülüklerin salgıları ya da biyolojik atıkları yoluyla dış çevreye yayılıp yayılmadığı da incelenmiştir. Elde edilen bulguların, sülük popülasyonlarının biyogüvenliği ve ekolojik sürdürülebilirliğinin anlaşılmasına katkı sunduğu ve bu organizmaların korunmasına yönelik sürdürülebilir yönetim stratejilerinin

gerekliliğini vurguladığı düşünülmektedir. Araştırma kapsamında, üreme açısından olgunlaşmış *Hirudo verbana* türüne ait 52 anaç sülük, deneysel çalışmaya dahil edilmiştir. Bu sülükler, HBV ile enfekte edilmiş insan kanı ile beslenmiştir. Daha sonra, yumurtadan (kokondan) yeni çıkmış yavru sülükler ile sülüklerin yaşadığı çevresel ortamlardan örnekler toplanmıştır. Bu örnekler arasında su, toprak, dışkı, vücut yüzeyi salgıları ve yumurta kabukları yer almıştır. Tüm örnekler, ileri düzey moleküler analiz teknikleri kullanılarak, özellikle kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle HBV varlığı açısından analiz edilmiştir. Toplamda 90 yavru sülük, 15 çevresel örnek ve 13 yumurta kabuğu üzerinde gerçekleştirilen analizlerde, HBV'ye ait herhangi bir pozitif bulguya rastlanmamıştır. Elde edilen bu sonuçlar, HBV'nin anaç sülüklerden yavrularına dikey bulaş yoluyla aktarılmadığını ve incelenen çevresel örneklerde de virüse dair herhangi bir iz tespit edilmediğini düşündürmektedir. Ayrıca, HBV'nin sülük salgıları veya dışkıları aracılığıyla çevreye yayılma olasılığının bu çalışma kapsamında düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, HBV'nin *Hirudo verbana* türü sülüklerde nesiller arası bulaş göstermediğine ve virüsün sülük kaynaklı biyolojik atıklar yoluyla çevreye yayılmadığına işaret eden bulgular elde edilmiştir. Bu veriler, söz konusu bulaşma yollarının muhtemelen etkisiz olduğunu düşündürmektedir, ancak daha geniş kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Bu bulgu, hem ekolojik hem de tıbbi açıdan önem arz etmektedir; zira sülük kaynaklı HBV bulaşma riskinin son derece düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, doğal sülük popülasyonlarının korunması ve güvenli, sürdürülebilir tıbbi uygulamaların desteklenmesinin önemi bir kez daha vurgulanmıştır. Sülüklerde patojenlerin nesiller arası aktarımı üzerine daha önce herhangi bir araştırma yapılmamış olması nedeniyle, bu çalışma, diğer enfeksiyöz ajanların potansiyel bulaşma yollarını değerlendirmek açısından da önemli bir bilimsel zemin sunmaktadır.

Haziran 2025, 80 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Transovaryal Nakil, Hepatit B Virüsü, Sülükler, *Hirudo verbana*, Ekolojik Güvenlik

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE ROLE OF MEDICINAL LEECHES AS POTENTIAL RESERVOIR HOSTS IN THE TRANSOVARIAL TRANSMISSION OF HEPATITIS B

NADIA IBRAHIM KAMIL KAMIL

**Kırsehir Ahi Evran University
Graduate School of Health Sciences
Medical Microbiology Department**

Supervisor: Dr. Asist. Prof. Alican BİLDEN

Leech therapy, also known as hirudotherapy, is one of the oldest and most well-known treatment methods in traditional alternative medicine. Throughout history, leeches have been used to treat a wide range of diseases due to their medicinal properties. Despite the effectiveness of leech therapy, one of its major concerns is the potential transmission of various pathogens. To mitigate this risk, leeches are typically destroyed immediately after use, a practice that negatively impacts both the sustainability of leech populations and their ecological environment. Given these concerns, our study aimed to investigate whether infectious agents, specifically the hepatitis B virus (HBV), are transmitted vertically through the leech's reproductive system (transovarial transmission). Additionally, we examined whether HBV is released into the external environment through the leech's secretions and biological excretions. The findings of this study contribute significantly to understanding the biological safety and ecological sustainability of leech populations, reinforcing the necessity of implementing sustainable management practices for their conservation.

To address these research questions, we conducted an experimental study using 52 reproductively mature leeches of the species *Hirudo verbana*. These leeches were fed human blood infected with HBV. Subsequently, we collected newly hatched juvenile

leeches along with various environmental samples associated with leech activity, including water, soil, feces, body surface secretions, and cocoon shells. The collected samples were then subjected to molecular analysis using advanced techniques, specifically quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), to detect the presence of HBV.

In total, we analyzed 90 juvenile leeches, 15 environmental samples directly associated with leech activity, and 13 cocoon shells. The results of our analysis were entirely negative, indicating that HBV was not detected in any of the juvenile leeches or the associated environmental samples. These findings suggest that HBV is not transmitted vertically from parent leeches to their offspring through reproductive processes. Furthermore, our data indicate that HBV is not released into the surrounding environment via leech secretions or other biological materials associated with leech activity.

The results of our study provide strong evidence that HBV is not transmitted across generations in *Hirudo verbana* and does not spread into the environment through leech-related excretions or secretions. This discovery holds significant ecological and medical importance, as it suggests that the risk of HBV transmission through leech populations is minimal. Moreover, our findings emphasize the importance of conserving natural leech populations while simultaneously ensuring safe and sustainable medical practices. Given the lack of previous research on vertical pathogen transmission in leeches, this study serves as a foundation for future investigations into whether other infectious agents may follow different transmission pathways in these organisms.

June 2025, 80 Pages

Keywords: Transovarial Transmission, Hepatitis B Virus, Leeches, *Hirudo verbana*, Ecological Safety

1. GİRİŞ

Antik çağlarda, modern ilaçların ve ileri tıp teknolojilerinin henüz gelişmediği dönemlerde, alternatif tıp, çeşitli hastalıkların tedavisinde temel bir yaklaşım olarak kullanılmaktaydı. Bu tedavi yöntemleri büyük ölçüde doğal kaynaklara dayanmakta olup, bitkiler, sinek larvaları (*Lucilia sericata*) ve sülükler gibi canlı organizmalar tedavi amaçlı kullanılmaktaydı (1).

Hirudoterapi (Sülük Tedavisi), yüzyıllardır kullanılmakta olup, son dönemlerde sülük tükürük salgısında bulunan hyaluronidaz, hirudin, bdellinler, faktör Xa inhibitörü ve kollajen gibi biyolojik olarak aktif birçok maddenin keşfi ile kullanım alanı genişlemiştir. Bu tedavi yöntemi, başta rekonstrüktif cerrahisinde (kopan uzvun yerine dikilmesinde ve flep cerrahisinde) olmak üzere romatizma, egzama ve fitik gibi hastalıkların tedavisine katkı sağlamaktadır. Kimyasal ilaçların yan etkileri, bireyleri geleneksel tıbbın sunduğu daha güvenli ve doğal alternatiflere yönlendirmiştir (2). Bu nedenle, sülük tedavisinin önemi vurgulanmalı ve hastalıkların tedavisinde rol oynayan bu aktif biyolojik maddelerin keşfi göz önünde bulundurulmalıdır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) gibi birçok uluslararası kuruluş da sülük tedavisinin etkinliğini onaylamış olup, modern tedavilerle birlikte uygulandığında daha etkili ve olumlu sonuçlar alındığı kanıtlanmıştır (3).

Bu açıklamalar, sülük tedavisinin farkındalığını artırmakla birlikte, bu yöntemin bazı olumsuz yönlerini de ortaya çıkarmıştır. Her ne kadar birçok faydası bulunsu da, sülükle tedavi, uygulamanın rastgele yapılması ve uzman olmayan kişiler tarafından uygulanması durumunda, kan yoluyla bulaşan hastalıkların yayılma riskini artırmaktadır. Bu sebeple, 27 Ekim 2014 tarihinde yayımlanan Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Resmi Gazetesi'nde, sülük tedavisine ilişkin kurallar belirlenmiştir. Bu kurallar, sülük tedavisinin steril bir ortamda, uzman kişilerce uygulanmasını ve hastalıkların bulaşma riskini önlemek amacıyla sülüklerin yeniden kullanılmaması ve kullanımdan sonra imha edilmesini zorunlu kılmaktadır (1).

1.1. Amaç

Tıpta sülüklerin kullanımı oldukça değerli bir uygulama olarak kabul edilmektedir. Güncel uygulamalara göre, tıbbi sülükler tek kullanımlık olarak değerlendirilmekte ve uygulamadan hemen sonra imha edilerek güvenli şekilde bertaraf edilmektedir. Bu uygulamanın temel amacı, hirudoterapi sonrasında oluşabilecek enfeksiyon risklerini en aza indirmektir. Ancak, sülüklerin her kullanımda imha edilmesi, sınırlı biyolojik kaynakların hızla tükenmesine yol açmaktadır. Bu nedenle, tıbbi sülüklerin enfeksiyon etkenlerini sindirme kapasitesine sahip olup olmadığı, bu etkenleri çevreye ya da yavrularına (transovaryal geçiş) aktarıp aktarmadığı sorusu önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, sülüklerde transovaryal geçişin mümkün olup olmadığını ve enfeksiyon etkenlerinin salgılar yoluyla dış ortama yayılıp yayılmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Elde edilen veriler, hem sürdürülebilir kullanım açısından hem de etik ve ekonomik kayıpların önlenmesi bakımından önem taşımaktadır.

1.2. Önemi

Ülkemizde ve tüm dünyada, son yıllarda hirudoterapi (sülük tedavisi) uygulamalarında ve ürünlerinin kullanımında ciddi bir artış gözlemlenmektedir. Bu uygulama, hem insan hastalıklarının tedavisinde hem de veteriner hekimlikte kullanılan sülük tedavisi eski çağlardan beri bilinmektedir. 20. yüzyılın başlarından bu yana sülüklerin tükürük salgısında bulunan biyoaktif maddelerin keşfi ile sülük tedavisi, modern tedaviyi destekleyici bir metot olarak yeniden önem kazanmıştır. Günümüzde, sülüğün bilinen 600'den fazla türü bulunmasına rağmen, tıbbi olarak yalnızca 15 türü kullanılmaktadır. Bu türler arasında en bilinenleri *Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbana* ve *Hirudo orientalis*'tir (4). Tıbbi sülüklerin kullanımı, kan dolaşım sistemleri ile doğrudan temas sonucu oluşabilecek bulaşma ve enfeksiyon risklerini önlemek amacıyla steril bir ortamda ve uzman doktor gözetiminde gerçekleştirilir. Bu tedavilerde kullanılan sülüklerin çeşitli enfeksiyon etkenlerini içermediğinden emin olmak gerekir. Bu işlemin yapılması hem zaman hem de maliyet açısından çeşitli zorlukları vardır. Bu sebeple, tedavi sonrasında sülükler, %70 etanol kullanılarak öldürülür ve tıbbi atık yönetmeliğine uygun olarak bertarafı sağlanır (5).

Hirudoterapi uygulamalarının artmasıyla birlikte, sülüklerin kullanım sonrası öldürülmesi, gelecekte bu canlıların sayısında azalmaya neden olabilecektir. Bu çalışmada, sülüklerin kontamine insan kanı emdikten sonra patojenlerin, sülük yavrularına geçmeyeceği yönündeki hipotezimizi doğrulamayı amaçlıyoruz. Hipotezimiz doğrulanabilirse, sülüklerin korunmasına, etik standartların yükseltilmesine ve gereksiz maliyetlerin azaltılmasına katkı sağlanacağını düşünmekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sülüklerin Tarihçesi

Sülüklerin tıbbi amaçlarla kullanımı, çok eski dönemlere dayanmaktadır. Antik Mısır ve Yunan medeniyetlerinde, ateşli hastalıkların tedavisinde sülüklerin kullanıldığına dair kanıtlar, yaklaşık 2500 yıl öncesine kadar gitmektedir. Bu dönemde sülükler, hastanın cildine uygulanarak kan emme yoluyla tedavide kullanılmıştır (6).



Şekil 2.1: Eski Yunan döneminde sülüklerin kullanımını gösteren çizimli kavanoz (7).

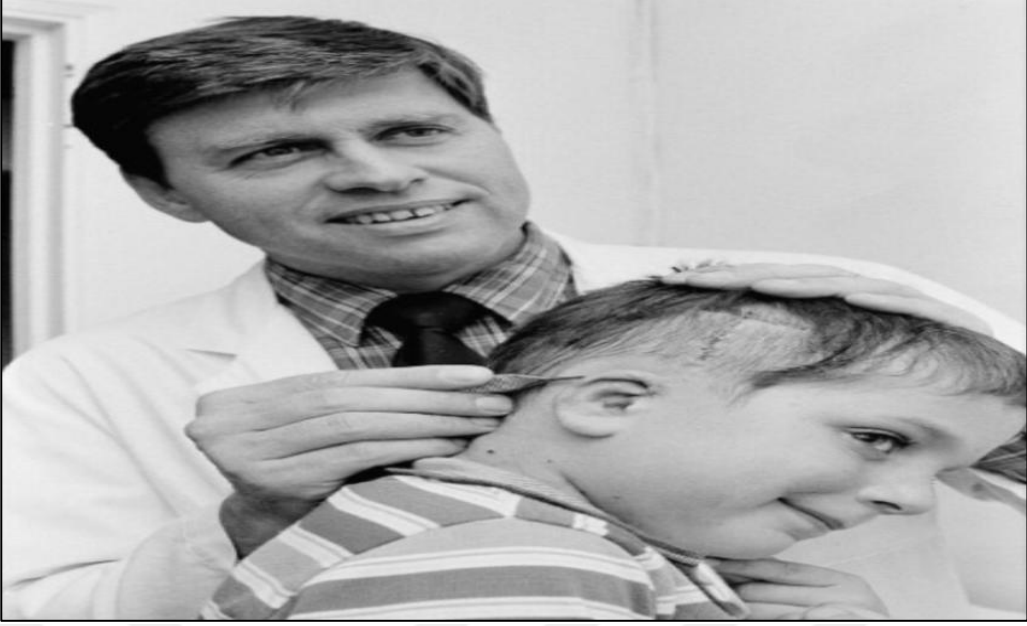
Kolophonlu Nicandros, MÖ 130-200 yılları arasında sülükleri tamamen tıbbi amaçla kullanan ilk kişi olarak kayıtlara geçmiştir. Roma döneminde Galen, sülükleri, vücuttaki kötü kanı uzaklaştırmak için kullanmıştır. Bu şekilde vücudun dengesini yeniden kazanmasına ve doğal işlevlerini yerine getirmesine yardımcı olmuştur. Ünlü bilgin İbn-i Sina da MS 987-1037 yılları arasında yazdığı ünlü eseri El-Kanun fi't-Tıb'da sülüklerden bahsetmiş, bu canlıların nasıl kullanılacağını ve sağladığı faydaları ayrıntılı bir şekilde açıklamıştır (8). MS 1233-1286 yılları arasında yaşamış olan İbn Maseehi, sülükleri tanımlamış ve özelliklerini detaylandırmıştır. “Kitabul Umda Fi Jarahat” adlı eserinde, zehirli sülükler ve tıbbi sülüklerin çeşitli türlerinden bahsetmiştir. Bu eserde, sülüklerin farklı renklerini, şekillerini ve kalınlıklarını ayrıntılı bir şekilde açıklayarak, tıbbi amaçlarla hangi sülüklerin kullanılabileceğine dair önemli bilgiler sunmuştur (8). Abdül Latif Bağdadi, on ikinci yüzyılda, sülüklerin cerrahi işlemler sonrasında dokuları tedavi

etmek ve temizlemek amacıyla kullanılabileceğini belirtmiştir. Sülük kullanımındaki asıl artış, on dokuzuncu yüzyılın ortalarında, Paris'teki Val de Grace Hastanesi'nin başhekimi ve Napolyon'un cerrahı olan Fransız doktor Francois Broussais'in sülüklerle frengi, tifo, tüberküloz ve psikolojik hastalıklar gibi birçok hastalığı tedavi etmesiyle yaşanmıştır. 1833 yılında Fransa'da 57 milyon sülük kullanılmış ve bu ülke, dönemin en büyük sülük tüketicisi olmuştur (6).



Şekil 2.2: Tarihsel süreçte sülük toplama, saklama ve uygulama yöntemlerine ait araç-gereçler; a) 1814 yılında sülüklerin toplanması; b) sülüklerin saklandığı kap, c) sülük uygulamak için kullanılan enjektör kiti (9).

19. yüzyılın başlarında Amerikalı bir doktor, hastalarında özellikle iltihaplanma veya tıkanıklık belirtileri ortaya çıktığında sülükleri tedavi amaçlı kullanmıştır. Sülükler hepatit, peritonit, tonsillit, miyokardit, pnömoni, gastrit, dizanteri ve akne gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmıştır. Ancak, frengi, lohusalık humması ve erizipel gibi hastalıkların bulaşmasına neden olabileceğine dair yaygın inanış nedeniyle sülüklerin kullanımı 19. yüzyılın sonunda önemli ölçüde azalmıştır. Tüm bu gelişmelerden sonra hirudoterapi, özellikle 20. yüzyılın ortalarında, parmak, kulak, kol, burun ve meme rekonstrüksiyonu gibi işlemlerde yeniden popülerlik kazanmıştır. Sülükler, cerrahi operasyonlar sırasında oluşabilecek venöz tıkanıklığı önleyerek ödem, arteriyel tromboz, iskemi ve nekroz gibi komplikasyonların engellenmesinde de etkin ve olumlu bir rol oynamaktadır (6).



Şekil 2.3: 1985 yılında iyileşme sürecini hızlandırmak için kulak greftine sülük uygulanması (9).

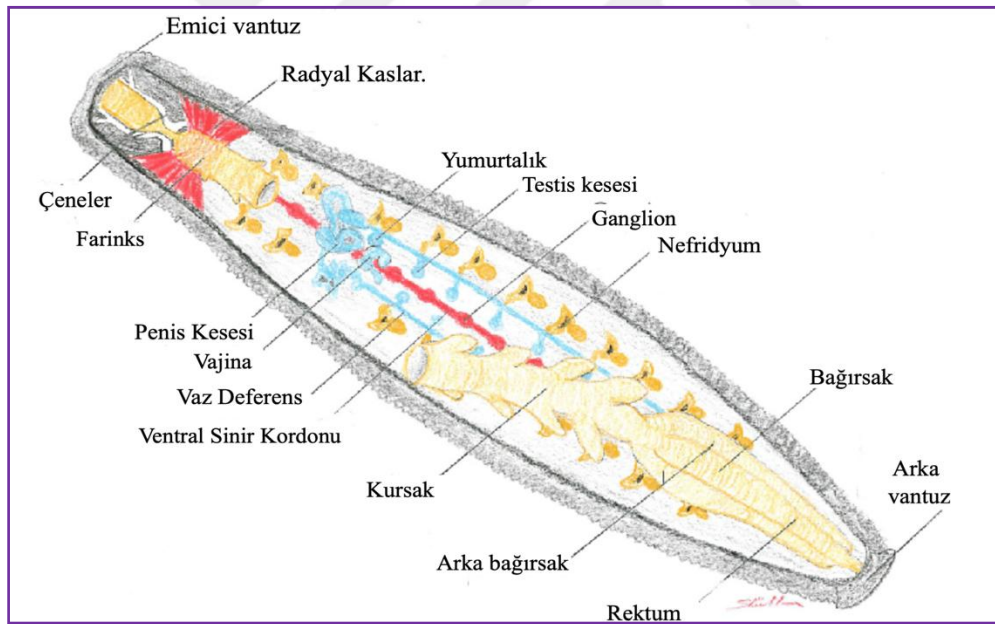
Başlangıçta sülükler tıbbi yararları tam olarak anlaşılamadan kullanılmaktaydı. Ancak, zamanla yapılan araştırmalar sonucunda sülüklerin 200’den fazla faydalı biyoaktif madde içerdiği keşfedilmiştir. Bu maddelerden bazıları aşağıdaki tabloda verilmiştir (10).

Tablo 2.1: Sülük tükürük salgısında bulunan biyoaktif maddeler (11–16).

Sülük Tükürüğünün İşlevleri	Tıbbi Farmasötik Biyoaktif Bileşikler
Analjezik ve antienflamatuar etki	Antitrypsin, Antiplasmin, Antistasin, Bdekins ve Bdektasin, Carboxypeptidase Q, Carboxypeptidase inhibitör, Eglin C, Ghilantens, Guamerin, Hirustasin, Kazal type inhibitor bdekin-KL, Leukocyte elastase inhibitor, Piguamerin, Plasma protease C1 inhibitor, Protease inhibitor, Subtilisin inhibitor or complex leech-derived tryptase inhibitor (LDTI), Complement C1 inhibitor
Hücre dışı matris bozulması	Agrin, Collagenase, Cystatin, Fibrinogen, Hyaluronidase, Hyaluronoglucuronidase, Membrane metallo-endopeptidase, Mucin, Neprilysin, Perlucin, Transgelin Zonadhesin
Trombosit fonksiyonunun inhibisyonu	Aspartylglucosaminidase, Saratin, Apyrase, Calin, Decorsin
Antikoagülan etki	Antithrombin-III, Destabilase-I, Ryncolin, The Factor Xa-like Trypsin, Hirudin, Gelin, Factor Xa İnhibitor, Destabilase, New Leech Protein-1, Whitide, Whitmanin
Kan akışının düzenlenmesi	Acetylcholine, histamine-like molecules
Antimikrobiyal etki	Bactericidal proteins, Destabilase-I, Chloromycetyn, Hirudomacin (HMC), Peptide B, Neuromacin, Theromacin, Theromyzin, 4-bromobutyric acid, Methoxy-phenyl, 2-aminoethyl hydrogen phosphate, Octahydro-1,4,9,9-tetramethyl, Decanoic acid, Octadecanoic (Stearic) acid, n-Octadecanoic acid,
Antimikrobiyal, antitümör, antimalaryal etki	1,3,6,10 Dodecatetraene, Oxalic acid, 2,2 Dimethylpropionic acid,
Antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, anestezi anti-kandida ve analjezik aktivite	Phosphonic acid, Octadecenyl aldehyde, Heptadecanoic (margaric) acid
Antimikrobiyal ve antitüberküler aktivite	Hexadecanoic (Palmitic) acid, Oleic acid,
Antimikrobiyal, antitümör, antiinflamatuar aktivite	6,17-Octadecadiene-1-ol acetate, 9,12-Octadecadienoyl chloride
Diğer fonksiyonlar	GLIPR1, Plancitoxin, Venom cystatin

2.2. Sülüklerin Anatomisi

Sülükler, 10 mm ile 45 cm arasında değişen uzunluklara sahip, küçük ve omurgasız canlılardır. Yaprak benzeri, esnek, düz ve spiral şekilleriyle karakterize edilirler. Ayrıca, iki adet emici diske sahip olmalarıyla da tanınırlar. Küçük ve ön kısmında yer alan emici diski (anterior), ağız, diş ve çene yapılarını içerirken, daha büyük ve arka kısımda yer alan emici diski (posterior) ise, sülüğün beslenme sırasında tutunmasını ve sabitlenmesini sağlar. Bu organizmalar, 10-12. segmentlerinde bulunan yumurtalıklar ve testisler nedeniyle hermafrodit olarak sınıflandırılır. Spermlerin bir sülükten diğerine aktarılması spermatoforlar aracılığıyla gerçekleşir. Klitellum, yumurtaları taşır ve kokonu (koza/yumurta) üretir. Döllenme, sülüğün klitellumdaki deliklere doğru hareket eden spermleri ürettiği döllenme yolu aracılığıyla gerçekleşir. Döllenme gerçekleştikten kokon toprağa bırakılır. Yavru sülükler yumurtadan çıkana kadar kokonda bulunan yumurta sarısı (albumin) ile beslenir. Yavru sülüklerin sayısı, döllenmiş yumurta sayısına bağlı olarak değişir (17).



Şekil 2.4: Sülüğün anatomisi (18).

Sülüklerin beslenmesinde kan azami öneme sahiptir. Beslenmeleri için konak canlıya tutunması ve kanı emmesi gerekmektedir. Vücuda tutunma esnasına üç kanatlı çene yapılarını kullanırlar. Ağızları, çene yapısının arkasında ventral olarak ön emici diskte bulunur ve sindirim sistemi, ağız, yutak, yemek borusu, mide, taşlık ve arka emici diskin sonuna kadar uzanan bağırsaklardan oluşur (17).

Sülük tükürük salgısında, beslenme sürecine yardımcı olacak biyolojik olarak aktif bir çok madde bulunmaktadır. Bu maddeler, kan akışının devam etmesine katkıda bulunur ve depolama sırasında yemek borusunda pıhtılaşmayı önler. Ayrıca, sülüğün ön emici diskinde bulunan ve kan emmek için en uygun yeri belirlemeye yarayan sensörler de mevcuttur. Bu sensörler, glikoz ve arter nabzını algılayarak çalışır. Sülüğün sindirim sisteminde, gerekli maddelerin sentezlenmesine ve zararlı mikroorganizmaların öldürülmesine yardımcı olan *Aeromonas veronii*, *Rikenella türleri*, *Eropobdella punctate*, *Pseudomonas aeromonas*, *P. hirudinicyla*, *Klebsiella spp.*, *Bacterium hirudinicolum* gibi birçok bakteri türü bulunmaktadır. Beslenme süreci 20 dakika ile 6 saat arasında sürer ve sülükler bu süreçte yaklaşık 5-15 ml kan emerler (17).

Sülüklerin sinir sisteminde büyük boyutlarda nöronlar olduğu için, detaylı nöron incelemelerinde sülükler ideal canlılar olarak kabul edilir. Sinir sistemleri; serebral ganglion, ventral ganglion, posterior ganglion, duyuşal reseptörler, faringeal ganglion ve kaudal gangliondan oluşur. Sülükler, 2-10 pigment spot ocelli ve duyuşal papilla varlığı nedeniyle fiziksel ve kimyasal etkileri tespit etme yeteneklerine sahiptir (17).

2.2.1. Sülüklerin Sınıflandırılması ve Çeşitleri

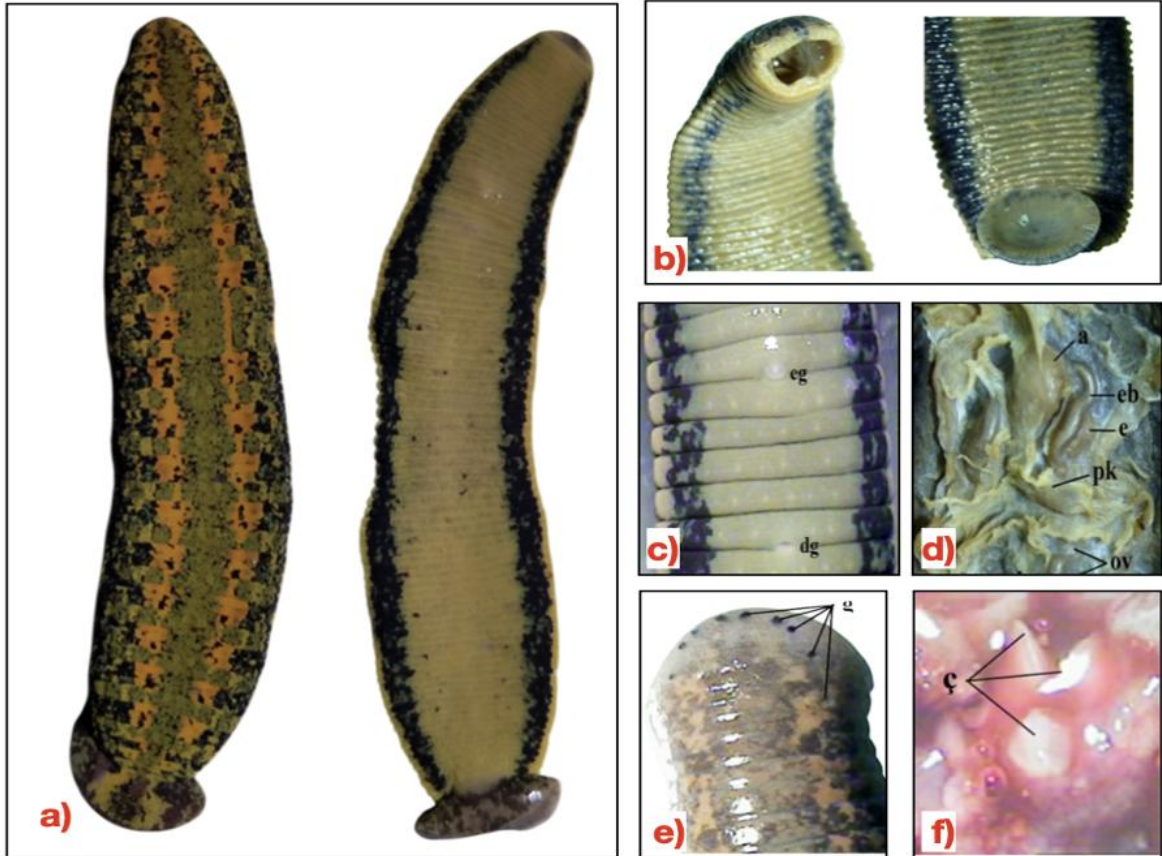
15.000'den fazla türü bulunan halkalı solucan grubunda bulunan sülükler kan emerek beslenen canlılardır. Tıbbi sülükler, *Annelida* filumu, *Clitellata* sınıfı ve *Hirudinidae* alt sınıfı içerisinde yer almaktadır. Dünya üzerinde bu sınıfta 800'ü aşkın üye bulunmakta ve bunların içerisinde tıbbi amaçla kullanılan yaklaşık 15 tür bulunmaktadır. Sülükler, yaşam alanlarına, anatomik yapılarına ve beslenme biçimlerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılırlar. Tıbbi sülüklerin de içerisinde bulunduğu Arhynchobdellida (çeneli sülükler) takımında yer alan türlerin keskin dişlere sahip çeneleri mevcuttur. Ayrıca balıklara yapışarak onların kanıyla beslenen ve Piscixolidae olarak bilinen sülük türleri de vardır (19). Kanla beslenen başka sülük türleri de mevcut olup, bu türlerin çeneleri bulunmaz. Bu sülükler *Rhynchobdellida* olarak adlandırılır; çünkü beslenmelerine yardımcı olan hortumlara sahiptirler. Bunun dışında, solucanlar, salyangozlar ve böcek larvaları gibi omurgasızlarla beslenen türler de mevcuttur. Bu sülükler kan emmek yerine avlanmaya dayalı bir beslenme şekli geliştirmiştir ve avcı sülükler olarak bilinirler. Ayrıca, karasal sülükler olarak adlandırılan bir başka tür de mevcuttur (20).

Tablo 2.2: Sülüklerin sınıflandırılması (21).

Eukaryota			
Metazoa			
Annelida			
Clitellata			
Hirudinida			
Hirudinidae			
<i>Hirudo</i>	<i>Hirudinaria</i>	<i>Macrobdella</i>	<i>Richardsonianus</i>
 <i>Hirudo verbena</i> (5)	 <i>Hirudinaria manillensis</i> sp.	 <i>Macrobdella decora</i> (22)	 <i>Richardsonianus australis</i> (23)
 <i>Hirudo troctina</i> (24)	 <i>Hirudinaria thailandica</i> (25)	 <i>Macrobdella diplotertia</i> (26)	 <i>Richardsonianus mauianus</i> (27)
 <i>Hirudo tianjinensis</i> (28)	 <i>Hirudinaria bpling</i> (29)	 <i>Macrobdella ditetra</i> (30)	
 <i>Hirudo sulukii</i> (5)		 <i>Macrobdella mimicus</i> (31)	
 <i>Hirudo orientalis</i> (5)		 <i>Macrobdella sestertia</i> (32)	
 <i>Hirudo nipponia</i> (33)			
 <i>Hirudo medicinalis</i> (5)			

2.2.2. *Hirudo verbana*

Hirudo verbana, hirudoterapide en sık kullanılan sülük türlerinden biri olup, tükürük salgısında farklı özelliklerde çeşitli biyoaktif maddeler mevcuttur (4). Yaklaşık 10-15 cm uzunluğunda silindirik bir gövdeye sahip olup, koyu kahverengi veya zeytin rengi üzerinde açık renkli çizgiler veya noktalar bulunur. Yaklaşık 34 segmentten oluşur ve beslenmeye yardımcı olan bir ön emici ile tutunmayı sağlayan bir arka emiciye sahiptir. Ayrıca, II, III, IVa1, Va1 ve VIa2 segmentlerinde yer alan beş çift siyah, nokta benzeri göze sahiptir. Ön emici, 4,2-7,5 mm büyüklüğündedir ve 7,0-9,1 mm büyüklüğündeki arka emiciden daha küçüktür. Ön emicide bulunan üç çene, yalnızca elektron mikroskobu ile görülebilen çok küçük dişlere sahiptir (34).



Şekil 2.5: *Hirudo verbana*'nın morfolojik yapısı ve üreme sistemine ait anatomik özellikleri; **a)** *Hirudo verbana*'nın dorsal ve ventral görünümü. **b)** Ön ve arka emici diskler. **c)** Genital açıklıklar; eg: Erkek genital açıklığı, dg: Dişi genital açıklığı. **d)** Üreme sistemi; a: Atrium, e: Epididimis, eb: Ejekülasyon bulbu, od: Ovidukt, ov: Ovaryum kesesi, v: Vajen, t: Testis kesesi. **e)** *Hirudo verbana*'nın gözleri. **f)** Çeneler (34).

2.3. Sülük Yetiştiriciliği

Yeryüzünde yaşayan çok sayıda sülük türü vardır. Bu sülük türlerinden bazıları tıbbi sülük olarak çok eski çağlardan beri bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu sülüklerin bir kısmı omurgalılarda, bir kısmı da omurgasız canlılarda ektoparazit olarak yaşamaktadır. Sülükler sulara bağımlı olmakla beraber, karasal ve yarı karasal formları da bulunmaktadır. Eski dönemlerde olduğu gibi, günümüzde de tam kontrollü laboratuvarlarda steril şartlar altında üretilen sülükler modern tıpta da kullanılmaktadır. Modern tıpta sülüğün kendisi veya sülüklerden elde edilen biyoaktif maddeler kullanılmaktadır. Sülüklerin üretilmesi zor olduğundan ve kültür şartlarında istenilen düzeyde üretilmemeleri nedeniyle doğadan toplanmaları tercih edilmektedir. Doğadan ticari amaçla sülüklerin aşırı toplanması ise sülük neslinin tehlikeye düşmesine neden olmaktadır. Uluslararası CITES (Nesli Tehlikede Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme - Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) sözleşmesiyle sülük neslinin devamı için bu canlılar koruma altına alınmış olup, sülük ihracatı yapan ülkelere kota uygulaması getirilmiştir (35). Bu çerçevede; doğadaki tıbbi sülüklerin neslinin korunması, kaçak yollarla yasadışı sülük ticaretinin önlenmesi, tıbbi sülüklerin merdiven altı uygunsuz hijyen koşullarında üretilmesinin engellenmesi ve Hirudoterapi uygulamalarının sürekliliğinin sağlanması açısından sülük yetiştiriciliğinin kontrollü bir şekilde yapılması gerekmektedir. Sülük yetiştiriciliği kapalı ortam ve açık ortam sülük yetiştiriciliği olmak üzere iki ana yöntemle yapılmaktadır (36).

2.3.1. Kapalı Ortam Sülük Yetiştiriciliği

2.3.1.1. Tank Modeli

Sülüklerin, doğadaki yaşam koşulları taklit edilerek oluşturulan, otomatize kapalı sistem modelidir. Tankın içerisine delikli kasalar veya baraj seti yapılarak bu model oluşturulur. Tankların içerisine, havalandırma ve su tutma kapasitesi yüksek perlitli torf toprağı, kesici delici olmayan taşlar ve bitki örtülerinin bırakılması büyük önem taşır. Bu durum, sülüklerin sürtünerek deri değişimini kolaylaştırırken, kokon verimini de artırmaktadır. Ayrıca sülüklerin havuzlardan kaçışını önlemek için silikon yardımıyla dar porlardan oluşan süngerler ile havuzların etrafı kapatılmalıdır. Bu modelde su sirkülasyonu anlık yapılabilmekte, tanklarda oluşabilecek herhangi bir kirlilik, kontaminasyon, enfeksiyon veya ölüm durumunda suyun ve sülüklerin tahliyesi kısa sürede yapılabilmektedir. Bu

modelde ayrıca anaç ve yavru sülüklerin beslenmeleri kolaylıkla yapılabilmekte, ölüm ve enfeksiyon takibi anlık gözlemlenebilmektedir. Raf modeline göre yavru verimi kısmen az olsa da, iş yükü açısından büyük kolaylık sağlamaktadır. Havuza konulan su miktarınca sülük adedi belirlenmelidir. Litre başına bir sülük olacak şekilde sülük sayısı belirlenmelidir. Sülük sayısının az olması durumunda döllenme azalacağından kokon verimi azalacaktır. Fazla olması durumunda ise enfeksiyon riski ile birlikte kokon verimi de düşecektir.



Şekil 2.6: Tank modeli.

2.3.1.2. Kavanoz/Raf Modeli

Bu modelde sülükler cam veya pet kavanozlarda tutulur. Cam kavanozlar, daha sağlıklı olmasına karşı plastik bidonlar hafif olması sebebiyle tercih edilmektedir. Anaç sülükler için 5 litrelik, diğer boylardaki sülükler için ise farklı ebatlarda kavanozlar kullanılabilir. Bidonların üçte ikisine su konulması ve büyüklüğü de göz önünde bulundurularak litre başına dört adet orta boy anaç sülük/on adet yavru sülük tercih edilebilir. Oksijen ihtiyacını karşılamak amacıyla bidonların kapaklarının ortası delinerek silikon yardımıyla tül ile kaplanır. Bu yöntemde su değişimi kolaylıkla yapılmaktadır. İki haftalık periyotlarla anaç sülüklerin gebelik çizgileri/rengi değişimi kontrol edilir. Gebeliği tespit edilen anaç sülüklerin her biri ayrı ayrı torf toprağının bulunduğu kavanozlara alınır ve kokon bırakması beklenir. Takip haftada bir yapılırken, bu süreç iki aya kadar

uzayabilir. Bu modelde verim kısmen daha fazla iken, iş yükü ve zaman kaybı açısından da dezavantajlıdır. Tank modeliyle karşılaştırıldığında enfeksiyon riski daha azdır.



Şekil 2.7: Raf modeli.

2.3.2. Açık Ortam Sülük Yetiştiriciliği

2.3.2.1. Havuz Modeli

Tank modelinin doğal ortama uyarlanmış halidir. Bu modelde yıl boyunca verimin alınabilmesi için iklimlendirmenin (sera) yapılması şarttır. Bunun yanında bu model iklim şartlarının uygun olduğu bölgelerde kullanılması tavsiye edilir. Çok sıcak veya çok soğuk bölgelerde bu modelin kurulum maliyeti yüksektir. Bu modelde havuzlar isteğe bağlı olarak 1-2 m derinlikte kazılır. Sızıntıyı engellemek için zemine ve duvar çeperlerine beton veya branda döşenir. Son olarak sülüklerin kokon bırakması için havuzun orta kısmına toprak ve bitki örtüsünden oluşan karasal bir alan oluşturulur. Bunun dışında suyun olduğu kısımlara su bitkileri ve kesici delici olmayan taşlar koyulur. Böylece daha doğal bir alan oluşturulur.



Şekil 2.8: Havuz modeli.

Sülükler çoğunlukla laboratuvar ortamında yetiştirilir ve bu nedenle kapalı ortam sülük yetiştiriciliği, insan sağlığı açısından güvenli ve sağlıklı sülük üretimini sağlayan etkili bir sistem sunduğundan, kirliliği önleme açısından en uygun yöntem olarak kabul edilir (36). Sülüklerin uygun şekilde yetiştirilmesi için önemli bazı standartların sağlanması gerekmektedir. Bu standartlar (37);

- Sıcaklık:

Sıcaklık, sülüklerin deri yüzeyinden su yoluyla solunum yapması nedeniyle kritik bir öneme sahiptir; su sıcaklığı sülüklerin yaşamını ve üremesini büyük ölçüde etkiler. Vücut suyu sıcaklığının 10,6 °C ile 35,4 °C arasında olması gerekirken, ortalama sıcaklık 25,6 °C olmalıdır (37).

- pH Seviyesi:

pH değeri büyük önem taşır; pH, suyun kimyasal yapısını ve hücre zarını etkilediği için sülüklerin yetiştirilmesi ve hayatta kalmasında kritik bir rol oynar. pH seviyesinin 6 ile 8 arasında olması sülüklerin yaşaması için uygun bir ortam sağlarken, optimum pH değeri 7,16 olarak kabul edilmektedir (37).

- Çözülmüş oksijen:

Çözülmüş oksijen miktarının belirlenmesi ve sülük yetiştiriciliği sırasında bu seviyenin izlenmesi, sülüklerin deri yüzeylerinden oksijen almaları nedeniyle büyük önem taşır. Su içerisindeki çözülmüş oksijen oranı genellikle 4,7 ile 7,3 mg l⁻¹ arasında değişmektedir (38).

- Elektriksel İletkenlik:

Elektriksel iletkenlik, sülük yetiştiriciliğinde önemli bir faktördür ve genellikle 430 ila 615 $\mu\text{S}/\text{cm}$ arasında değişir (38).

- Suyun toplam çözünmüş katı madde miktarı:

Sudaki toplam çözünmüş katı maddeler için minimum sınır 1110 mg/L, maksimum sınır ise 5050 mg/L'dir. Bu aralık içinde, 2367 mg/L ideal sınır olarak kabul edilmektedir (37).

2.4. Hirudoterapi Uygulamalar

Sülükler, tarih boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış ve içerdiği biyolojik olarak aktif maddeler, iyileşme sürecinde önemli bir rol oynamıştır. Haycraft'ın sülük tükürüğünde antikoagülan olarak kabul edilen hirudinin bulunduğunu keşfetmesinden sonra, sülüklerin kullanımı daha da yaygınlaşmıştır (39). Rekonstrüktif ve plastik cerrahi alanındaki önemli rolü ve etkinliği de kanıtlanmış olup, bu durum Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 yılında sülük kullanımını tanımasına ve satışına izin vermesine yol açmıştır (40). Hirudinin yanı sıra, antiplazmin görevi gören bdellin gibi diğer önemli özelliklere sahip maddeler de sülük tükürüğünde bulunmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı parça II ve III, decorcin, ornatin, apyras, anti-trombosit proteinler ve kalın gibi maddeler de iltihabı azaltmakta ve eklem hareketliliğini artırmaya çalışmaktadır. Bu maddelerin kanama süresinde artışa neden olduğu da kanıtlanmıştır (41–44).

Kimyasal ilaçların kullanımının çeşitli istenmeyen yan etkileri olabilir; bu nedenle sülüklerle tedavi, sülük tükürüğünde bulunan maddeler sayesinde bu yan etkileri azaltmayı hedeflemektedir. Örneğin, osteoporoz tedavisinde kullanılan steroid ilaçlar buna örnek gösterilebili (45, 46). Ancak sülük tedavisinin birçok faydasına rağmen, özellikle alerjik hastalıkları olan kişiler, lösemi, hemofili, bağışıklık yetmezliği olanlar ve hamile kadınlar için bazı riskler taşıyabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, bu tür durumları olan kişilere sülük tedavisi uygulanmasından kaçınılması önerilir (47). Ayrıca, kronik T-hücresi infiltrasyonunun bir sonucu olarak boyun ve yüz çevresinde ortaya çıkan eritematöz papüller ve plakların oluşumuyla karakterize edilen psödolenfoma gibi durumlara da neden olabilir (48). Sülüklerin ağız ve vücut floralarında, gerekli besinlerin sentezlenmesinde rol oynayan *Aeromonas* türleri bulunmaktadır. Bu nedenle, sülük tedavisi öncesinde, enfeksiyon riskini azaltmak amacıyla sefalosporin gibi antibiyotiklerin kullanılması önerilir (49, 50).

2.4.1. Plastik Cerrahi ve Ortopedik Uygulamalarda Hirudoterapi

Sülükler, dolaşım bozuklukları sonucu venöz konjesyondan etkilenen dokuların tedavisinde son 50 yılda yaygın olarak kullanılmaktadır. Dejanc ve Zdravec, 1960 yılında ilk kez tıkalı plakları tedavi etmek için sülük kullanmışlardır (51). 1980'lerde Fransız doktorlar, sülükleri plastik ve rekonstrüktif cerrahilerde arterlerin 13 saatten fazla, venlerin ise 3 saatten fazla tıkanması sonucu oluşan nekrozu önlemek amacıyla kullanmışlardır (52, 53). Sülükler, günümüzde de plastik ve rekonstrüktif mikrocerrahide kullanılmaya devam edilmektedir. Ayrıca, gut, artrit ve romatizma gibi birçok hastalığın tedavisinde, bu hastalıklarla ilişkili ağrıyı hafifletmek amacıyla ve Diklofenak'tan daha az yan etkiye sahip olan DING proteini inhibitörleri kullanılarak uygulanmaktadır (54, 55).



Şekil 2.9: Mikrovasküler serbest flepte gelişen venöz konjesyonun sülük tedavisi ile klinik seyri. A) ciddi venöz konjesyon ile karakterize edilen hirudoterapi öncesi durum, B) hirudoterapi sonrası durum (56).

2.4.2. Yara ve Ağrı Tedavisinde Hirudoterapi

Diyabetli hastalar, genellikle şiddetli ağrıya yol açan ve iyileşmesi uzun süren kronik yaralardan muzdariptir. Bu bağlamda, sülük tedavisi, diyabetle ilişkili ağrıyı hafifletmeye ve yaraların iyileşme sürecini hızlandırmaya yardımcı olabilir. Ayrıca, kronik bölgesel ağrı (CRPS) sendromlarının iyileşmesine katkıda bulunur (57, 58). Sülükler, aktif biyolojik maddelerin varlığı nedeniyle mikrosirkülasyonu ve hipoksiyi düzenleyerek bu hastalıklarla ilişkili ağrının hafifletilmesine de yardımcı olur. Bu özellikleri sayesinde sülük tedavisi, kanser ve migren gibi nedeni bilinmeyen birçok hastalığın tedavisinde de etkili olabilir (45, 59–61).



Şekil 2.10: Migren ve diyabetik ayak ülserlerinde sülük tedavisi uygulamaları. **a)** migren ağrıların tedavisinde sülüklerin terapötik kullanımı (62). **b)** diyabet kaynaklı ayak ülserlerinin tedavisinde sülüklerin kullanımı (63).

2.4.3. Hirudoterapinin Ağız ve Diş Sağlığındaki Önemi

Sülük tükürüğündeki biyoaktif maddelerin keşfi, bu maddelerin ağız hastalıklarının tedavisinde kullanılmasını sağlamış ve genetik mühendislik sayesinde bu maddelerden ilaç üretme potansiyelini ortaya çıkarmıştır. Sülük tükürüğünde bulunan maddeler, kronik diş eti iltihabı ve hipertansiyonun iyileşme sürecini hızlandırarak ağız dokularına verilen zararı en aza indirir. Bu sayede, diş eti ve diş sorunlarının tedavisinde önemli bir rol oynar ve hastaların yaşam kalitesini artırır (64, 65).



Şekil 2.11: Diş ve diş eti problemlerinin tedavisinde sülüklerin kullanımı (66).

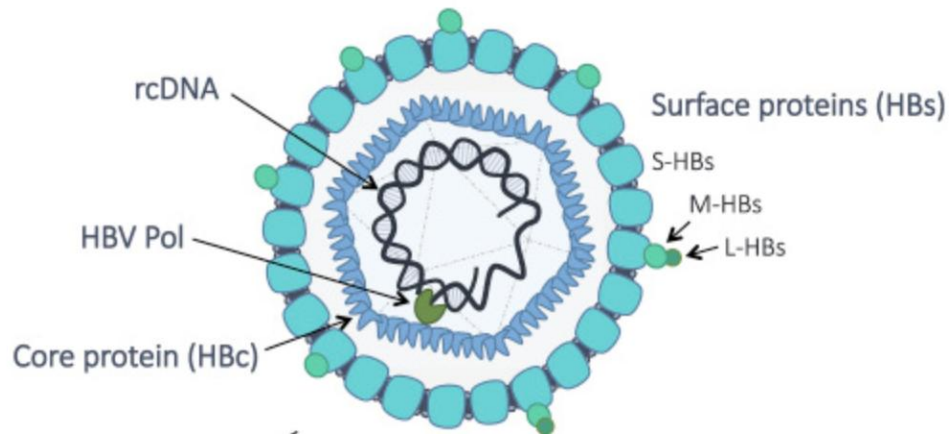
2.5. Hepatit B virüsü

Hepatit, karaciğerde iltihaplanmaya yol açan ve potansiyel olarak karaciğer yetmezliği, kanser veya siroz gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilen bir hastalık grubudur. Hepatit virüsleri, özellikle karaciğeri hedef almakla birlikte, morfolojileri, etki mekanizmaları, bulaşma yolları ve hastalığın ciddiyeti açısından farklılık gösterirler. Hepatit virüslerinin beş ana türü bulunmaktadır: Hepatit A, Hepatit B, Hepatit C, Hepatit D, Hepatit E ve daha yakın dönemde keşfedilen yeni bir tür olan Hepatit G (67). Bu türlerden bazıları, örneğin Hepatit A ve Hepatit E, fekal-oral yolla bulaşır; kontamine su veya gıda tüketimi sonucu enfeksiyon meydana gelir. Diğer türler, örneğin Hepatit B, Hepatit C ve Hepatit D ise konjenital, parenteral ya da cinsel yolla bulaşabilmektedir (67).

İstatistiklere göre, dünya genelinde Hepatit B ile enfekte olan bireylerin sayısının 300 milyondan fazla olduğu ve bu enfeksiyona bağlı olarak her yıl bir milyona yakın ölüm gerçekleştiği tahmin edilmektedir (67). Türkiye'de Hepatit B ile enfekte olmuş bireylerin sayısının da 3,3 milyondan fazla olduğu tahmin edilmektedir (68). Hastalığın komplikasyonlarından kaynaklanan ölüm oranının, dünya genelinde yılda yaklaşık 500.000 ile 700.000 arasında değiştiği belirtilmektedir. Türkiye'de Hepatit B virüsünün (HBV) görülme sıklığı üzerinde yaş, cinsiyet, farkındalık düzeyi ve göç gibi çeşitli faktörlerin etkili olduğu saptanmıştır. Örneğin, HBV enfeksiyonu 46 yaş ve üzeri bireylerde daha

yaygın olarak görülmektedir. Erkeklerde kadınlara kıyasla %5 oranında daha yüksek bir prevalans göstermekte; ayrıca düşük gelirli bireylerde ve Türkiye'nin doğu ile güneydoğu bölgelerinde yaşayan kişilerde HBV ile enfekte olma riski daha yüksek bulunmuştur (69).

Hepatit B virüsü, doğrudan cinsel temas ve steril olmayan enjeksiyonların kullanımı yoluyla yatay olarak bulaşabileceği gibi, doğum sırasında anneden çocuğa dikey olarak da bulaşabilir. Hastalarda semptomlar görülebileceği gibi, hastalık asemptomatik de seyredebilir. Başlangıçta semptomlar arasında bulantı, kusma, anoreksi veya karın ağrısı yer alırken, ciddi vakalarda bu semptomlar karaciğer hasarı, sarılık, kanama, enfeksiyonlar, hepatik ensefalopati ve koagülopati şeklinde kendini gösterebilir (70). Hepatit B virüsü (HBV), hepatotropizm gösterme yeteneğine sahip olup, bu özellik sayesinde akut veya kronik enfeksiyonlara yol açarak hepatoselüler karsinomaya neden olabilir (71).



Şekil 2.12: Hepatit B virüsün yapısı (72).

HBV (Hepatit B virüsü), Hepadnaviridae familyasına ait küçük bir virüstür. 3200 baz çifti içeren kısmen çift sarmallı bir DNA'ya sahiptir. Bu DNA, kısa ve uzun iplikçiklere sahiptir; uzun iplikçik pregenomik RNA'yı tamamlayıcı olup, bu özelliği nedeniyle (-) iplikçik olarak adlandırılırken, daha kısa olan iplikçik (+) iplikçik olarak bilinir. DNA, ayrıca bir protein zarfı tarafından çevrelenmiş bir kapsid içinde bulunur (73). HBV aşısı, ilk kanser karşıtı aşı olarak kabul edilmektedir. 1980'li yıllardan itibaren, enfekte bir hastanın plazmasından HBsAg'nin subviral partikülleri toplanarak bu aşı geliştirilmiştir. Ancak, bu plazmalardan elde edilen aşılarda patojen taşıma riski nedeniyle endişeler ortaya çıkmıştır. Bu sorunları aşmak amacıyla, maya türevi HBsAg kullanılarak rekombinant HBV aşısı geliştirilmiş ve bu aşılarda HBV'ye karşı koruyucu bağışıklık sağlama konusunda olumlu sonuçlar vermiştir. Doğal HBV virüsü preS alanına ve glikozilasyona

sahipken, rekombinant aşıda bu özellikler bulunmamaktadır. Rekombinant aşı, özellikle yaygınlığın yüksek olduğu bölgelerde HBV'ye bağlı hastalıkların azalmasına katkıda bulunmuştur. Aşının dozajı 5-40 µg rekombinant HBsAg ve alüminyum fosfat veya alüminyum hidroksit gibi adjuvanları içerir. HBsAg'ye karşı antikorların konsantrasyonu, korumanın ve uzun vadeli etkinliğin sağlanması için düzenli olarak ölçülür; 10 mIU/mL veya daha yüksek antikor konsantrasyonunun, takviye dozlarına gerek kalmadan etkili bir koruma sağladığı kabul edilmektedir. Aşı dozu, yaşa ve kullanılan ürüne bağlı olarak değişmektedir. Prevalansın yüksek olduğu bölgelerde, sağlık çalışanları ve annelere çocuklarına bulaşmayı önlemek amacıyla aşı yapılması önerilmektedir (74).

2.6. Transovaryal Geçiş (Bulaş)

Patojenlerin konaklar arasında yayılma mekanizması bulaş olarak adlandırılır. Bu bulaşma süreci, enfeksiyon etkenlerinin (bakteriler, virüsler, mantarlar ve protozoonlar dahil olmak üzere) yayılmasını sağlar. Bulaş, genellikle iki ana kategoriye ayrılır:

- ✓ Yatay Geçiş (Horizontal Transmission)
- ✓ Dikey Geçiş (Vertical Transmission)

Yatay Geçiş (Horizontal Transmission):

Yatay bulaşma, patojenlerin aynı türe ait bireyler arasında aktarılmasını ifade eder. Bu bulaşma, bireyler arası doğrudan veya dolaylı temas yoluyla gerçekleşir.

- Hava yoluyla bulaşma: Grip virüsü (Influenza), hapşıрма veya öksürme yoluyla havaya karışan damlacıklar aracılığıyla yayılır (75).
- Fekal-oral yol: Norovirüs ve rotavirüs gibi etkenler, kontamine gıda veya suyun tüketilmesi sonucu bulaşabilir (76).
- Vektör aracılı bulaşma: Sivrisinekler veya keneler gibi eklem bacaklılar, patojenleri taşıyarak farklı bireylere bulaştırabilir (77).

Yatay bulaşma, hastalıkların hızlı yayılmasına neden olabilir ve salgın oluşumunda kritik bir rol oynar.

Dikey Geçiş (Vertical Transmission):

Dikey bulaşma, patojenlerin anneden yavrusuna aktarılmasını ifade eder. Bu geçiş aşağıdaki yollarla gerçekleşebilir:

- Plasenta yoluyla: Annenin kan dolaşımından fetusa bulaşan HIV, sifiliz ve hepatit B gibi patojenlerdir (78).
- Doğum sırasında: Enfekte doğum kanalından geçen bebeklerde, herpes simpleks virüsü (HSV) bulaşı gözlemlenebilir (79).
- Emzirme yoluyla: HIV ve HTLV-1 gibi bazı virüsler anne sütü aracılığıyla bulaşabilir (80).
- Transovaryal Geçiş (Bulaş)

Transovaryal geçiş, patojenlerin enfekte bir dişi bireyden yumurtalar aracılığıyla doğrudan yavrulara aktarıldığı özel bir dikey bulaşma mekanizmasıdır. Bu mekanizma, yavruların yumurtadan çıktıkları anda enfekte olmalarını sağlar.

Transovaryal bulaş, özellikle artropod vektörlerde (keneler, sivrisinekler ve diğer eklem bacaklılar) yaygındır ve patojenlerin doğal döngüsünün sürekliliğini sağlayan kritik bir mekanizmadır. Bu süreç sırasında en az bir yumurta veya larva enfekte olur ve patojenin varlığı sürdürölerek yaşam döngüsünde kalıcılığı sağlanır (81).

2.6.1. Transovaryal Geçiş ile Bulaşan Patojenler

Virüsler:

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKA): *Hyalomma* keneleri tarafından transovaryal olarak taşınır (82).

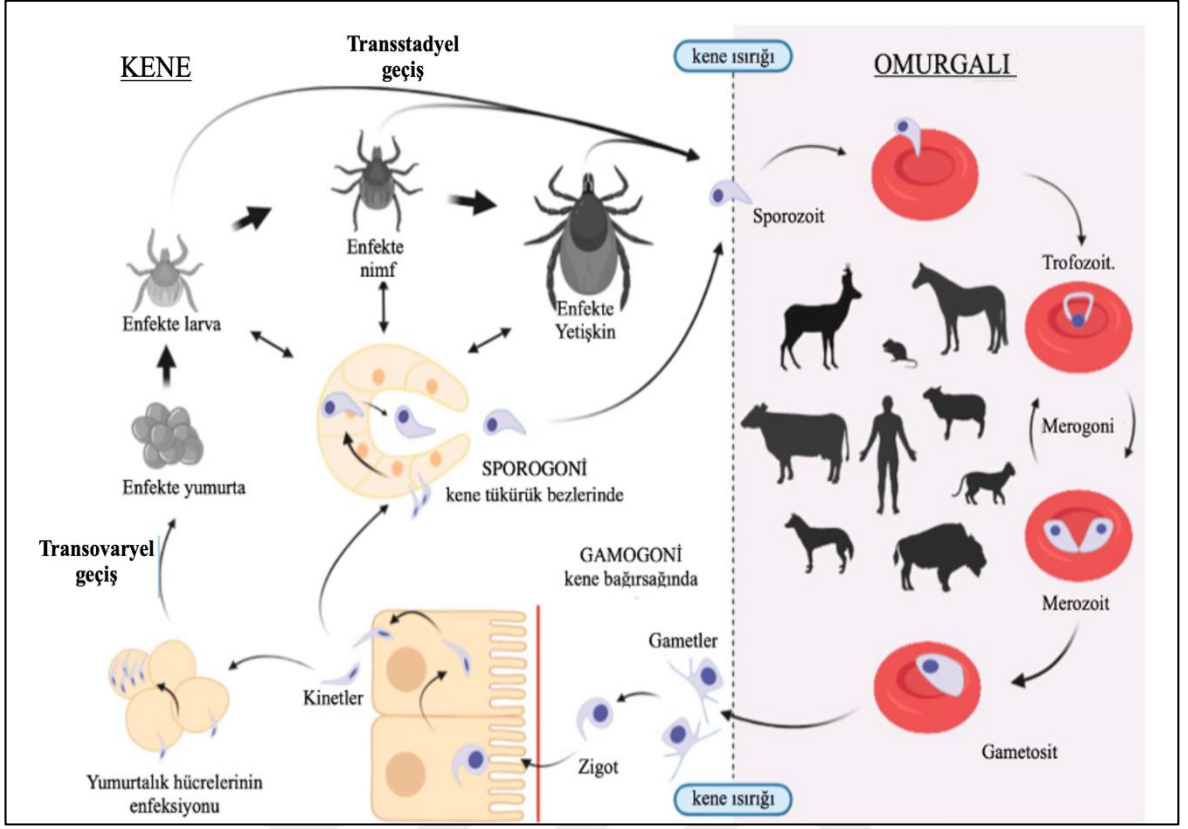
Kene Kaynaklı Ensefalit Virüsü (TBEV) ve Powassan Virüsü (POWV): *Ixodes* keneleri aracılığıyla yayılır (83).

Bakteriler:

Rickettsia rickettsii: Kayalık Dağı Benekli Ateşi'nin etkenidir ve *Rhipicephalus sanguineus* kenesi tarafından transovaryal olarak aktarılabilir (84).

Protozoonlar:

Babesia bigemina: Sığır babesiyozundan sorumlu protozoon olup, *Rhipicephalus microplus* kenelerinde transovaryal olarak taşınır (85).



Şekil 2.13: *Babesia* spp. sensu stricto'nun yaşam döngüsü (84).

Omurgalı konaklar, enfekte sert kenelerin ısırmasıyla, kene tükürüğünde bulunan sporozoitlerin konak eritrositlerine invazyonu sonucunda enfekte olur. Eritrosit içinde sporozoitler, aseksüel çoğalma süreci olan merogoni ile merozoitlere veya gametlere farklılaşan trofozoitlere dönüşür. Merozoitler yeni eritrositleri enfekte edebilirken, gametositojenik evrim geçiren hücreler gametlere dönüşür. Kene, kan emme sürecinde enfekte eritrositleri alır ancak yalnızca gametositler hayatta kalır ve kenenin orta bağırsağında gametlere dönüşerek gelişimlerine devam eder. Daha sonra, gametlerin birleşmesiyle zigot oluşur ve bu zigot, kenenin orta bağırsağındaki epitel hücrelerine girerek kinetlere dönüşür. Kinetler, mayotik bölünme yoluyla hareketli hale gelir ve kenenin yumurtalıkları ile tükürük bezlerine yayılır. Yumurtalık dokularının istilası transovaryal bulaşa, tükürük bezlerine olan yayılım ise vertebralı konağa bulaşan sporozoitlerin oluşmasına neden olur (86).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Besleme Kanının Temini

Bu çalışmada kullanılan besleme kanı, Kırşehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Viroloji Laboratuvarı tarafından RT-qPCR yöntemiyle Hepatit B tanısı konulan bir hastadan elde edildi. Söz konusu hastadan, etik kurallar çerçevesinde ve ilgili onayların alınmasının ardından, 450 mL (bir ünite) kan alındı (Bkz EK-1). RT-qPCR analizi sonucunda, hastanın viral yükü $6,5 \times 10^5$ IU/mL olarak tespit edildi. Çalışmada kullanılan anaç sülüklerin beslenmesinde bu kan, besleme kanı olarak değerlendirildi.

3.2. Sülüklerin Temini ve Beslenmesi

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Sülük Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen, ağırlıkları 2 ile 4,2 gram arasında değişen toplam 52 genç anaç sülük, deney öncesinde üç ay süreyle aç bırakılarak hazırlandı. Üç aylık açlık süresinin ardından, sülüklerin beslenmesi amacıyla kuru bağırsak içerisine 36-37 °C'ye ısıtılmış besleme kanı dolduruldu ve bu bağırsak, anaç sülüklerin bulunduğu kaba konuldu (Şekil 3.1). Bu sayede sülüklerin bağırsak yüzeyine tutunarak beslenmeleri sağlandı (Şekil 3.2).

Beher kullanılarak, besleme kanı insan kanının sıcaklığını taklit etmek amacıyla su banyosunda dikkatlice 36-37 °C'ye kadar ısıtıldı. Bu sıcaklığın korunması, kanın canlı kanla benzer özelliklerini muhafaza etmesi açısından son derece önemliydi. Böylece, sülükler için besleyici bir kaynak olma niteliği artırıldı. Sülüklere kan vermek için besleme kanalı olarak kurutulmuş bir hayvan bağırsağı kullanıldı. Kullanımdan önce, bağırsak su banyosuna kısa bir süre daldırılarak yeniden nemlendirildi. Bu adım, bağırsağın yumuşamasını ve kan karışımı ile doldurulabilecek kadar esnek hale gelmesini sağlamak açısından kritik bir öneme sahipti. Daha sonra, kan dikkatlice bağırsağa aktarıldı ve hem kanın hem de bağırsağın özelliklerinin korunması için işlem boyunca sıcaklık kontrollü koşullarda sürdürüldü. Bu titiz hazırlık, besleme ortamının doğal koşullara en

yakın şekilde oluşturulmasını sağladı ve bylece anaç sülüklerin sağlığı ile üreme başarısı üzerinde olumlu bir etki oluşturdu. Kanın sıcaklığının dikkatle yönetilmesi ve bağırsağın yeniden nemlendirilmesi, beslenme ortamının bütünlüğünü korumak açısından büyük önem taşıymaktaydı ve bu durumun üreme başarısı üzerinde ciddi bir etkiye sahip olduğu görüldü.



şekil 3.1: Besleme kanının hazırlanması.

Çeşitli besleme yöntemleri, parafilm ve elek kullanımı da dahil olmak üzere test edildi. Ancak, kanın sülüklere verilmesi açısından en etkili yöntemin kurutulmuş bağırsak kullanımı olduğu belirlendi. Kurutulmuş bağırsağın kullanımı, diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha tutarlı ve kontrollü bir besleme sağladı. Potansiyel kan kusma riskini

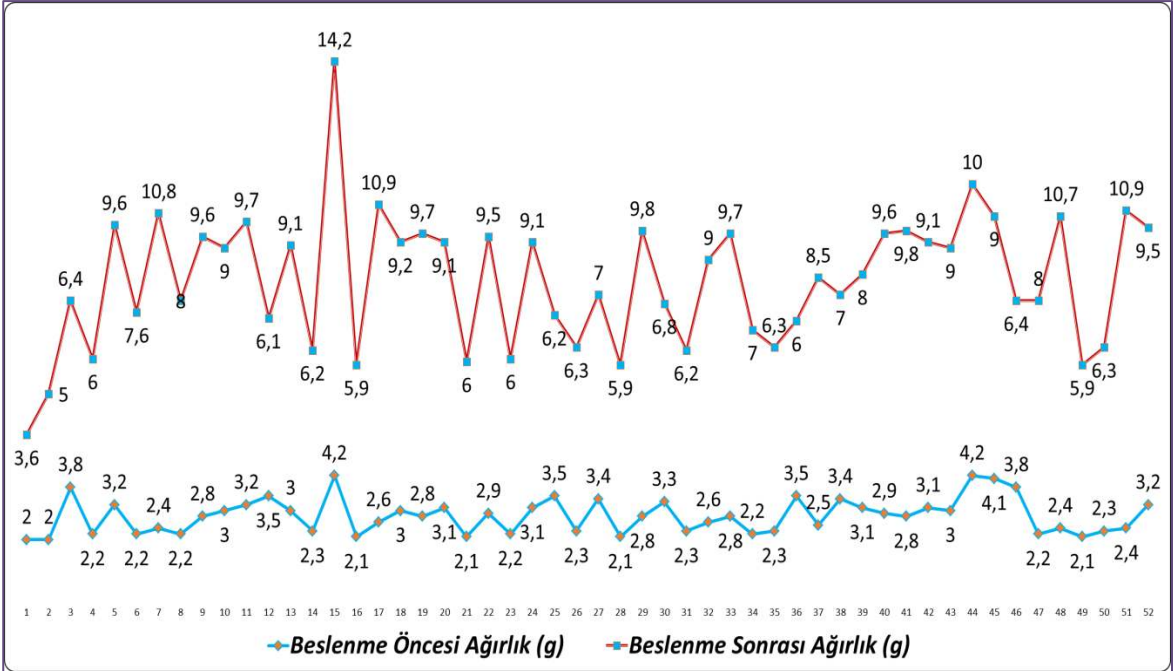
yönetmek amacıyla, sülükler doğrudan ana kaplara aktarılmadan önce ayrı bir kapta bekletildi. Bu uygulama, ana habitatın kontaminasyonunu önlemek amacıyla gerçekleştirildi. Kan besleme işleminden bir hafta sonra, sülükler dikkatlice orijinal kaplarına geri aktarıldı.

Su değişimleri için, klor içermediğinden emin olmak adına en az 24 saat boyunca açık bir kapta bekletilen su kullanıldı. Haftalık olarak, kap açıldı, sülükler pens ile toplanarak ayrı bir kapta geçici olarak muhafaza edildi. Kap içerisinde bulunan torf sepeti ve taşlar çıkarıldı ve kap, sünger ve su kullanılarak temizlendi. Temizlik işleminin tamamlanmasının ardından, torf sepeti, taşlar ve klor içermeyen su yeniden kap içerisine yerleştirildi ve sülükler habitatlarına geri kondu. Su değişimi ve kan besleme süreçlerinde kullanılan tüm malzemeler, titiz bir sterilizasyon protokolüne tabi tutuldu. Tamamen dezenfekte edilmelerini sağlamak amacıyla, bu malzemeler 24 saat boyunca çamaşır suyunda bekletildi. Sterilizasyon işlemi sonrasında, malzemeler bol musluk suyu ile durulandı ve böylece olası kimyasal kontaminasyonun önüne geçildi. Bu titiz prosedürler, sülüklerin sağlığını ve güvenliğini sağlamak, deneysel koşulların bütünlüğünü korumak ve kontaminasyon riskini en aza indirmek amacıyla uygulandı. Bu protokollerin düzenli ve tutarlı bir şekilde uygulanması, deney sonuçlarının güvenilirliği ve geçerliliği açısından kritik bir öneme sahip oldu.



Şekil 3.2: Sülüklerin Hepatit B ile kontamine kan ile beslenmesi.

Beslenme sonrasında, her bir sülüğün ağırlığının en az iki katına çıktığı görüldü. Tüm sülükler bireysel olarak tartıldı ve beslenme öncesi ile sonrası ağırlıkları kaydedildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Anaç sülüklerin ağırlık değişimleri.

Sülüklerin beslenme işlemi tamamlandıktan sonra, aynı parametrelerine sahip suya transfer edildi (Şekil 3.7). Yaklaşık bir aylık kuma dönemi sona erdiğinde, sülükler kokon üretimi için toprak havuzlara yerleştirildi. Bu süreçte, iki haftada bir kokon takibi yapıldı ve sülüklerin bulunduğu su haftada iki kez değiştirildi. Ayrıca, tüm sülüklerin canlılık durumları ve davranışları günlük olarak izlendi. Bu süreç toplamda yedi ay boyunca devam etti.

3.3. Deney Düzenekinin Kurulması ve Numunelerin Toplanması

Bu çalışmaya toplamda 52 adet *Hirudo verbana* türü sülük dahil edildi. Deneysel ortam, her bir sülük için 1 litre su olacak şekilde düzenlendi, 60 litre su kapasitesine sahip bir havuz kullanılarak oluşturuldu. Sülüklerin doğal yaşam koşullarını taklit etmek amacıyla, havuzun ortasına, su tutma kapasitesi yüksek, gübre ve kimyasal madde içermeyen torf toprağı, delikli bir kasa içerisinde yerleştirildi (Şekil 3.4). Havuzun geri kalan kısımlarına ise suyun içerisine farklı boyutlarda bahçe taşları konuldu. Anaç sülükler havuza yerleştirilmeden önce, suyun parametrelerinin pH 6,8–7,2, sıcaklık 24–25 °C, çözünmüş oksijen (D.O.) %80–90 ve elektriksel iletkenlik 20–50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ arasında olmasına özen gösterildi. Çalışma süresince havuzdaki su haftada iki kez değiştirilerek gerekli hijyen ve su kalitesi sağlandı.



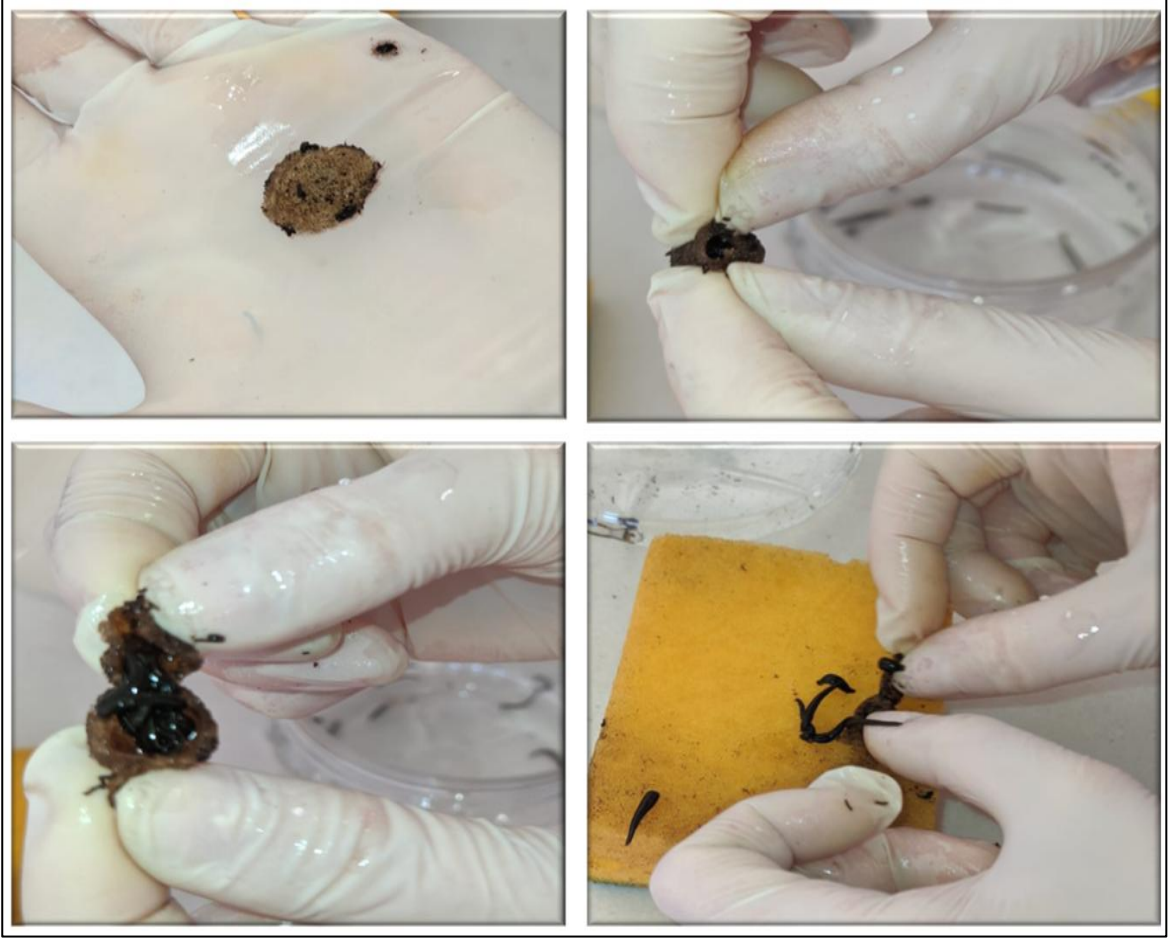
Şekil 3.4: Sülüklerin kontrollü koşullarda barındırıldığı deneysel habitat.

Yedi aylık çalışma süresi boyunca, yaklaşık 40-45 günde bir sülüklerle ilişkili numuneler toplandı. Bu numuneler; “su ve toprak”, “sülük dışkısı” ve “sülük vücut salgısı” olarak adlandırıldı ve -20 °C’de saklandı. Ayrıca, her iki haftada bir anaç sülüklerin bulunduğu toprak kontrol edildi, sülükler tarafından bırakılan kokonlar toplanarak uygun koşullara sahip ayrı bir toprağa yerleştirildi. Yavruların çıkması için 35 gün beklendi, bu sürenin ardından tüm kokonlar elle açıldı (Şekil 3.6) ve içinden çıkan yavrular tek tek sayıldı. Yavrular ve kokon kabukları numaralandırıldı ve -20 °C’de muhafaza edildi.

Çalışma süresi içerisinde anaç sülüklerden ölen olmadı. Çalışma sonunda, 52 anaç sülük arasından rastgele seçilen 5 sülük seçildi, sakrifiye edildi ve -20 °C’de saklandı. Ayrıca, test güvenilirliğini sağlamak ve viral yük değişimini değerlendirmek amacıyla, çalışma sürecinin altıncı ayında besleme kanı ile beslenen bir pozitif kontrol sülüğü ve sağlıklı kan ile beslenen bir negatif kontrol sülüğü de sakrifiye edilerek -20 °C’de saklandı.



Şekil 3.5: Anaç sülüklerden toplanan kokonlar.



Şekil 3.6: Süre bitiminden sonra kokonların manuel açılması.



Şekil 3.7: Kontaminasyonu önlemek amacıyla yavru ve anaç sülüklerin ayrı kaplarda tutulması.

3.4. Kimyasal Malzemeler

Çalışmamızda, farklı amaçlar doğrultusunda çeşitli kimyasal ajanlar kullanıldı; bunlar arasında sterilizasyon, besleme ve DNA izolasyonu ile amplifikasyonu yer aldı. Sterilizasyon amacıyla, Hepatit B Virüsü'nü (HBV) inaktive etme konusundaki kanıtlanmış etkinlikleri nedeniyle alkol ve çamaşır suyu tercih edildi. Bu uygulama ile, virüse maruz kalma riski taşıyan malzemelerin ve ortamların kullanım sonrasında güvenli hale getirilmesi ve kontaminasyondan arındırılması sağlandı. Alkol (etanol), proteinleri denatüre etme ve viral zarfı bozma yeteneğiyle bilinirken, çamaşır suyu ise viral DNA ve proteinleri parçalama özelliğiyle öne çıkmaktadır (87). Bu sterilizasyonların kombinasyonu, hem laboratuvar güvenliği hem de deneyin bütünlüğü açısından kritik olan steril bir çalışma ortamının sağlanması adına etkili bir yöntem sundu.

DNA izolasyonu için iki farklı kit kullanıldı: DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Almanya) ve PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, ABD). Her kit, örneklerin yapısına göre seçilmiş olup, DNA veriminin ve saflığının optimize edilmesi amaçlandı. Özellikle, DNeasy Blood & Tissue Kit, anaç sülüklerden, yavru sülüklerden ve kokon kabuklarından DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. PowerSoil DNA Isolation Kit ise çevresel örneklerden, örneğin su, toprak, anaç sülüklerin dışkısı ve vücut yüzeyi salgılarından DNA izolasyonu için tercih edildi. Her kitin temel bileşenleri ve görevleri aşağıda açıklanmıştır:

- DNeasy Blood & Tissue Kit:
 - ✓ DNeasy Mini Spin Kolonları: DNA'nın ekstraksiyon sürecinde ayrıştırılmasını sağlamak için 2 ml toplama tüpleri ile birlikte kullanıldı.
 - ✓ 2 ml Toplama Tüpleri: Örneklerin toplanması ve izolasyon sürecinde çeşitli çözeltileri tutmak için kullanıldı.
 - ✓ Buffer AL: Hücre zarlarını bozarak DNA'nın hücrelerden serbest kalmasını sağlayan bir lizis tampon olarak kullanıldı.
 - ✓ Buffer ATL: Doku matrisini parçalamak ve doku örneklerinden DNA'nın serbest bırakılmasına yardımcı olmak için kullanıldı.

- ✓ Buffer AW1 ve Buffer AW2: DNA'nın bütünlüğünü korurken, kontaminantların ve diğer istenmeyen materyallerin DNA'dan uzaklaştırılmasını sağlamak için kullanıldı.
- ✓ Buffer AE: Saflaştırılmış DNA'nın spin kolonundan çözeltinin içine salınmasını ve daha sonraki uygulamalarda kullanılabilir hale gelmesini sağlamak için kullanıldı.
- ✓ Proteinaz K: Nükleazlar gibi DNA'yı bozabilecek proteinleri sindiren bir enzimdir ve izolasyon sürecinde DNA'nın sağlam kalmasını temin etmek için kullanıldı.
- PowerSoil DNA Isolation Kit:
 - ✓ PowerBead Tüpleri: 750 µl çözeltisi içeren bu tüpler, toprak partiküllerinin mekanik olarak parçalanmasına yardımcı olurken, humik asitlerin çözünmesini ve DNA'nın bozulmadan korunmasını sağlamak için kullanıldı.
 - ✓ 2 ml Toplama Tüpleri: Örneklerin toplanması ve izolasyon sürecinde çeşitli çözeltileri tutmak için kullanıldı.
 - ✓ Spin Filtreleri: Filtrasyon adımlarında kritik bir bileşen olan bu filtreler, DNA'nın filtreye bağlanmasını sağlamak ve safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla kullanıldı.
 - ✓ PowerSoil® Çözeltisi C1: Hücre duvarlarını ve zarlarını açarak hücre lizisini sağlayan SDS (sodyum dodesil sülfat) ve diğer ajanları içerdiğinden, çevresel örneklerde yaygın olarak bulunan yağ asitleri ve lipidlerin parçalanması amacıyla kullanıldı.
 - ✓ PowerSoil® Çözeltileri C2 ve C3: Proteinler, polisakkaritler ve DNA'nın saflığını ve kalitesini bozabilecek diğer kontaminantlar gibi organik ve inorganik maddelerin çökelterek uzaklaştırılması amacıyla kullanıldı.
 - ✓ PowerSoil® Çözeltisi C4: Filtrasyon sürecinde DNA'nın spin filtrelerine bağlanarak, diğer materyallerden uzaklaştırılması amacıyla kullanıldı.
 - ✓ PowerSoil® Çözeltisi C5: DNA, filtrelerden ayrıştırılmadan kalan tuzlar, humik asitler ve diğer kontaminantlar bir yıkama çözeltisi kullanılarak uzaklaştırıldı; bu sayede temiz ve saf bir DNA örneği elde edildi.

- ✓ PowerSoil® Çözeltisi C6: Saflaştırılmış DNA'yı silika membrandan serbest bırakmak için kullanılan bir elüsyon tamponudur.
- Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR):

Örneklerde Hepatit B Virüsü (HBV) tespiti için Anatolia Geneworks (Türkiye) tarafından sağlanan RT-qPCR kitleri kullanıldı. RT-qPCR ile spesifik DNA dizileri çoğaltıldı ve miktarları belirlendi. Bu süreçte, başarılı DNA amplifikasyonunun sağlanması için birbiriyle uyum içinde çalışan birkaç kritik bileşeni içeren dikkatlice optimize edilmiş bir reaksiyon karışımı kullanıldı. RT-qPCR için gerekli temel materyaller şunlardır:

- ✓ Kalıp DNA: Örnekten izole edilen DNA, amplifikasyon hedefi olarak kullanıldı.
- ✓ Primerler: HBV DNA'sına bağlanarak seçici amplifikasyonu sağlamak amacıyla kit içinde bulunan kısa ve spesifik diziler kullanıldı.
- ✓ DNA Polimeraz: PCR sırasında yeni DNA iplikçiklerinin 5'-3' yönünde sentezlenmesi için ısıya dayanıklı enzim (örneğin, Taq polimeraz) kullanıldı.
- ✓ $MgCl_2$: Polimeraz aktivitesinin artırılması ve dNTP'lerle olan etkileşimlerin stabilize edilmesi amacıyla bir kofaktör olarak eklendi.
- ✓ dNTP'ler: Yeni DNA sentezi için gerekli yapı taşları (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) reaksiyon karışımına dahil edildi.
- ✓ Tampon Çözeltisi: Enzim fonksiyonunun korunması ve uygun pH ile iyonik dengenin sağlanması için kullanıldı.
- ✓ Nükleaz İçermeyen Su: Reaksiyon hacminin ayarlanması ve DNA'nın bozulmasının önlenmesi amacıyla eklendi.

3.5. Cihazlar ve Diğer Malzemeler

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi, düzey deneysel araştırmaları desteklemek amacıyla çeşitli laboratuvar cihazları ve malzemelerle donatılmıştır. Bu cihazlar, moleküler biyoloji, genetik ve mikrobiyoloji gibi farklı disiplinlerde yürütülen araştırmaların hassasiyetini ve güvenilirliğini artırmaktadır. Araştırmaların etkin bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlamak için kullanılan temel cihazlar ve malzemeler şunlardır:

- ✓ Otoklav: Malzemeler sterilize edilerek kontaminasyon önlenir.
- ✓ Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C): Kan örnekleri ve hassas malzemeler saklanır.
- ✓ Vorteks Karıştırıcı: Reaktiflerin iyice karışması sağlanır.

- ✓ Hassas Terazî: Deneylerde kullanılan malzemeler hassas bir şekilde tartıldı.
- ✓ pH Metre: Çözeltilerin pH seviyesi ayarlandı ve izlendi.
- ✓ İnkübatör: İnkübasyon sırasında sabit sıcaklık sağlandı.
- ✓ Su Banyosu: Deneylerde kullanılan kan örnekleri ısıtıldı.
- ✓ PCR Cihazı: Genetik analiz için gen amplifikasyonu yapıldı.
- ✓ Santrifüj: DNA, diğer bileşenlerden ayrıştırıldı.
- ✓ Nanodrop: DNA/RNA saflığı ve konsantrasyonu ölçüldü.
- ✓ Saf Su Cihazı: Çözelti hazırlığı için yüksek saflıkta su sağlandı.
- ✓ Mikropipet: Küçük miktarlardaki sıvılar hassas bir şekilde ölçüldü.
- ✓ Termometre: Su ve kan sıcaklığı izlendi.
- ✓ Elektroforez Cihazı: DNA parçaları boyutlarına göre ayrıştırıldı.
- ✓ Laminar Kabini: Deney sırasında kontaminasyon önendi.
- ✓ UV Transillüminatör: Jellerde ayrıştırılmış DNA parçaları görselleştirildi.

Bu cihazlar, geniş bir yelpazede deneysel protokollerin hassas ve güvenilir bir şekilde uygulanmasını mümkün kılarak araştırmaların kalitesi artırıldı. Araştırmacıların Hepatit B Virüsü (HBV) maruziyetine karşı korunması ve kontaminasyonun önlenmesi amacıyla lateks eldivenler, plastik eldivenler ve yüz maskesi gibi kişisel koruyucu ekipmanlar (PPE) kullanıldı. Sülüklerin kontrollü bir ortamda barındırılması ve yetiştirilmesi için plastik bidonlar ve kaplar kullanıldı, güvenli bir şekilde tutulmaları için ise özel pensler tercih edildi. Çalışma alanının temizliği için 4 litrelik leğen ve bulaşık süngerleri temizlik işlemlerinde kullanıldı, hassas diseksiyon uygulamaları için neşter bıçağı tercih edildi. Besleme düzeneklerinin güvenliği parafilm ile sağlandı, su değişimi sırasında sülüklerin etkin yönetimi için ise süzgeç kullanıldı.

Moleküler biyoloji uygulamalarında, DNA amplifikasyonu için PCR tüpleri kullanıldı; ölü sülüklerin ve diğer biyolojik örneklerin toplanması ve saklanması amacıyla 15 ml ve 50 ml Falkon tüpleri ile Eppendorf tüpleri tercih edildi. Sıvıların hassas ve kontaminasyondan arındırılmış bir şekilde transfer edilmesi için ise pipet uçları vazgeçilmez bir bileşen oldu.

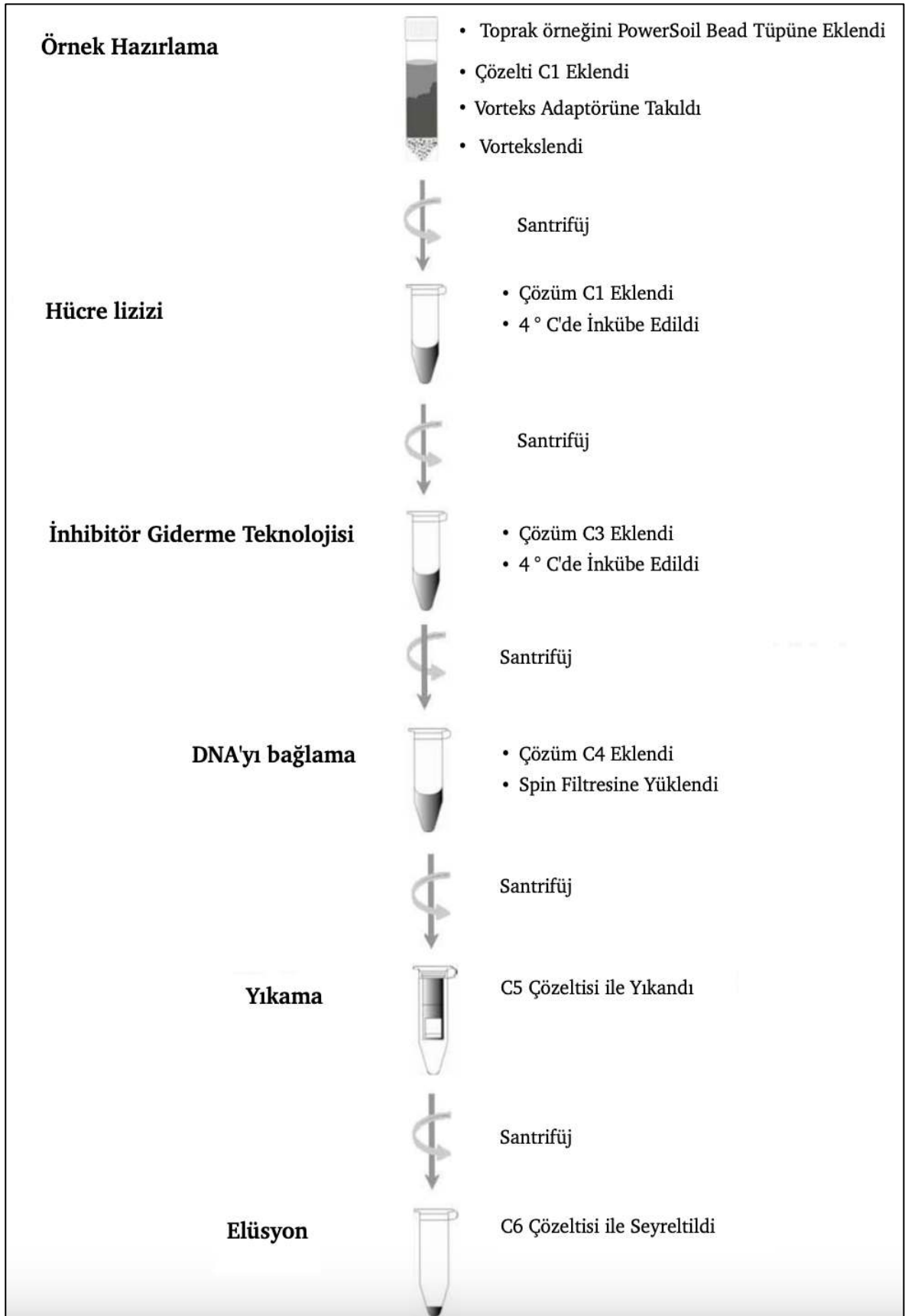
Bu malzemeler, deneysel prosedürlerin en yüksek güvenlik ve doğruluk standartlarına uygun şekilde gerçekleştirilmesini sağladı.

3.6. DNA İzolasyonu ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR

3.6.1. PowerSoil DNA İzolasyon Kiti

0.25 g toprak, su, anaç sülük dışkısı ve anaç sülüklerin vücut yüzeyi salgılarından oluşan örnekler hazırlandı. Her örnek ayrı PowerBead tüplerine eklendi. Bu tüpler, homojenizasyon ve lizis işlemlerini sağlamak amacıyla toprak parçacıklarının dağılmasına, humik asitlerin çözülmesine ve DNA'nın bozulmasını engellemeye yardımcı olur. Karışımlar vortex ile karıştırıldı. C1 çözeltisi 60 °C'de ısıtılarak tüm çökeltilerin çözülmesi sağlandı ve her örneğe 60 µL eklendi. C1 çözeltisi, hücre lizisini destekleyen ve hücre zarlarındaki yağ asitlerini ve lipidleri parçalayan SDS ve diğer yıkım ajanlarını içerir. PowerBead tüpleri oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 10.000 × g hızında santrifüj edildi ve süpernatant temiz bir 2 mL toplama tüpüne transfer edildi. DNA'yı saflaştırmak için 250 µL C2 çözeltisi eklendi, vortex ile karıştırıldı ve 4 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Inkübasyonun ardından tüpler 10.000 × g hızında 1 dakika santrifüj edildi. Bu adım, DNA dışı organik ve inorganik materyallerin uzaklaştırılmasını sağladı. 600 µL süpernatant, yeni bir 2 mL toplama tüpüne aktarıldı, pellet kısmından kaçınıldı. Ardından 200 µL C3 çözeltisi eklendi, vortex ile karıştırıldı ve 4 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Tüpler tekrar 10.000 × g hızında 1 dakika santrifüj edildi. 750 µL süpernatant, pelletten kaçınarak temiz bir 2 mL toplama tüpüne aktarıldı. Sonrasında 1,2 mL C4 çözeltisi süpernatanta eklendi ve DNA'nın spin filtresine bağlanmasını sağlamak için vortex ile karıştırıldı. 675 µL süpernatant spin filtreye eklendi ve 10.000 × g hızında 1 dakika santrifüj edildi. Akıtılan sıvı atıldı ve bu adım 3 kez tekrarlandı. DNA'nın spin filtresinde kalan tuz, humik asit ve diğer kirleticilerden temizlenmesi için 500 µL C5 çözeltisi (etanol bazlı yıkama çözeltisi) eklendi ve 30 saniye boyunca 10.000 × g hızında santrifüj edildi. Akıtılan sıvı atıldıktan sonra, residüel C5 çözeltisinin PCR veya jel elektroforezi ile etkileşimini önlemek amacıyla tüpler 10.000 × g hızında 1 dakika santrifüj edildi.

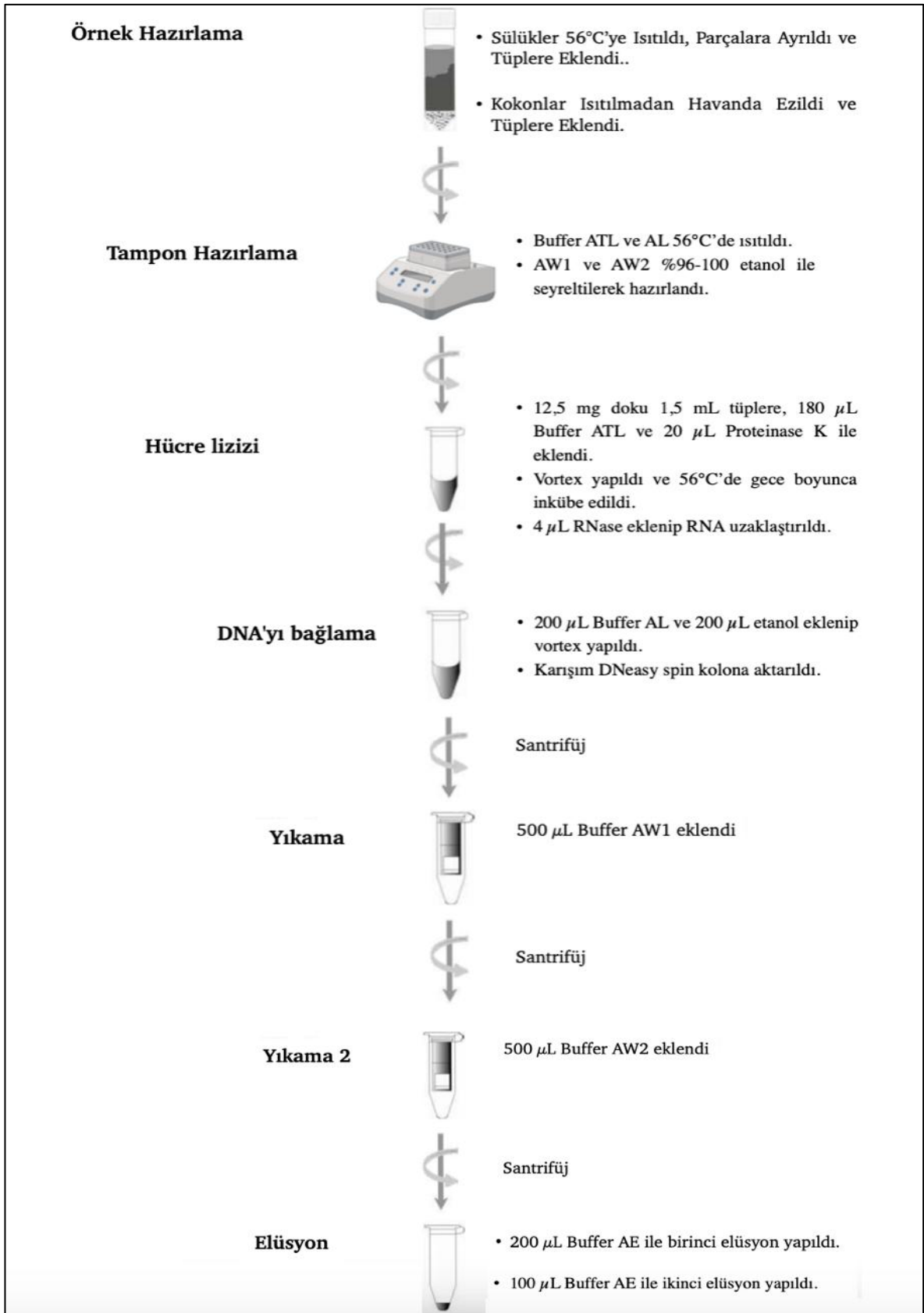
Son olarak, spin filtre temiz bir 2 mL toplama tüpüne yerleştirildi ve DNA'nın silika spin filtre membranından tamamen serbest kalmasını sağlamak için 100 µL C6 çözeltisi eklendi. Çözelti, 30 saniye boyunca 10.000 × g hızında santrifüj edildi ve ardından spin filtre atıldı. Toprak, su, anaç sülük dışkısı ve anaç sülüklerin vücut yüzeyi salgılarından elde edilen DNA örnekleri, PCR işlemi için hazır hale getirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.8: PowerSoil Kiti ile toprak kaynaklı DNA izolasyon protokolü.

3.6.2. DNeasy Blood & Tissue Kit:

Anaç sülükler, kontrol sülükler, yavru sülükler ve kokon kabuklarının DNA ekstraksiyonu için DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) kullanıldı. Numuneler farklı zamanlarda toplandı ve sülüklerin çoğu öldükten sonra -20  C'de bir tp içinde saklandı. Örnekler, daha kolay ezilebilmesi için sıvı azota yerleştirildi, ardından havanda ezilip distile su ile karıştırıldı ve 10.000 × g hızında 2 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, PCR analizi için toplandı. Diğer örneklerde ise DNA ekstraksiyonundan önce sülükler dondurucudan çıkarıldı, 56  C'ye ısıtıldı ve bir neşter kullanılarak parçalara ayrıldı. Kokon kabukları ise doğrudan, herhangi bir ısıtma işlemi uygulanmadan havanda ezilerek küçük parçalara ayrıldı. DNA izolasyonu, çalışmanın gereksinimlerine uyacak şekilde küçük değişiklikler yapılarak üretici protokolüne göre gerçekleştirildi. Ekstraksiyona başlamadan önce, Buffer ATL ve Buffer AL 56  C'de ısıtılarak ilerinde varsa herhangi bir çökelti çözüldü. AW1 ve AW2 tamponları ise %96-100 etanol ile kitin talimatlarına uygun olarak seyreltildi. Protokol, hayvan dokuları için maksimum 25 mg başlangıç materyali  nerse de, DNeasy spin kolonunun aşırı yüklenmesini önlemek amacıyla her numunede 12,5 mg doku kullanıldı. Her bir numuneden 12,5 mg doku, ayrı 1,5 mL mikro santrifüj tüplerine yerleştirildi ve ardından 180  L Buffer ATL ve 20  L Proteinase K eklendi. Karışım 5-10 saniye vortexlenerek homojen hale getirildi ve doku parçalanmasının tam olarak gerçekleşmesini sağlamak amacıyla 56  C'de inkübe edildi. Inkübasyon sırasında numuneler birkaç kez kısa sürelerle vortexlendi. Tam bir doku lizizi sağlamak için numuneler gece boyunca inkübasyonda bırakıldı. RNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için her bir numuneye 4  L RNase eklendi, 5-10 saniye vortexlendi ve 15-25  C'de 2 dakika inkübe edildi. Ardından numunelere 200  L Buffer AL eklendi ve 5-10 saniye vortexlenerek karışım homojenleştirildi. Hemen ardından 200  L %96-100 etanol eklendi ve 5-10 saniye boyunca tekrar vortexlenerek karıştırıldı. Lizat, 2 mL toplama tüpüne yerleştirilmiş DNeasy Mini spin kolona aktarıldı ve oda sıcaklığında 6000 × g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alt faz ve toplama tüpü atıldı, spin kolon yeni bir 2 mL toplama tüpüne yerleştirildi. Sonraki adımda, spin kolona 500  L Buffer AW1 eklendi ve oda sıcaklığında 6000 × g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alt faz ve toplama tüpü atıldıktan sonra spin kolona 500  L Buffer AW2 eklendi ve 20.000 × g'de 3 dakika santrifüj edilerek DNeasy membranı kurutuldu ve etanol kalıntılarından arındırıldı. Alt faz ve toplama tüpü atıldı; spin kolon, etanol ile temas etmeyecek şekilde dikkatlice çıkarıldı (şekil 3.5).

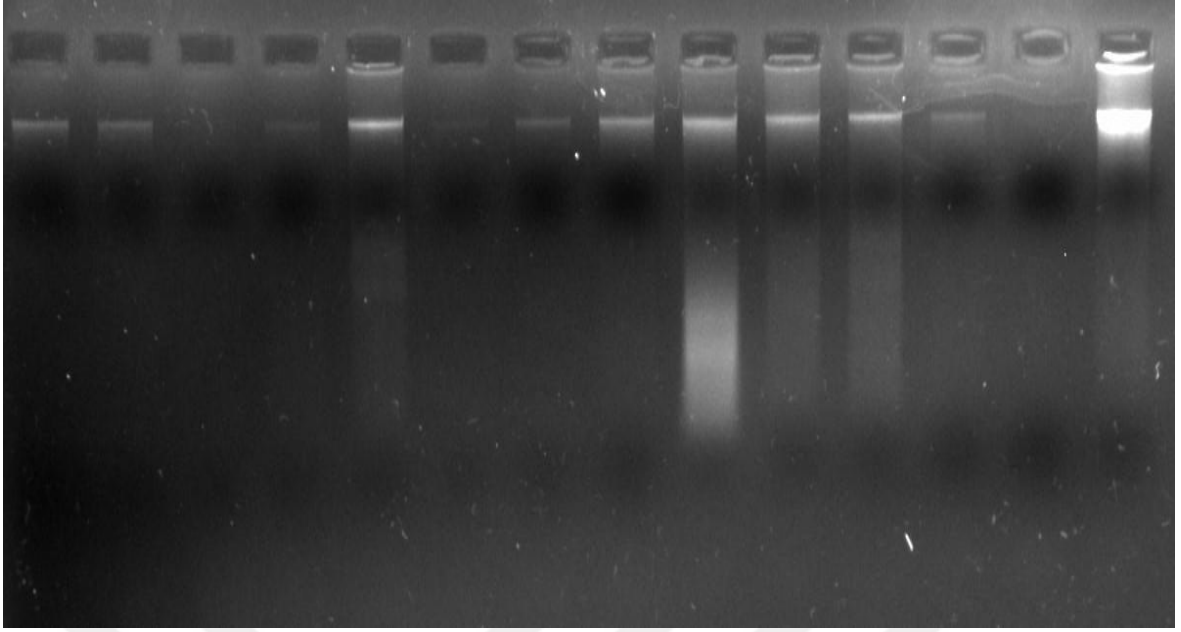


Şekil 3.9: DNeasy Blood & Tissue kiti kullanılarak uygulanan DNA izolasyon prosedürü.

Spin kolon tüpleri temiz 2 mL'lik mikro santrifüj tüplerine yerleştirildi ve 200 µL Buffer AE, doğrudan DNeasy membranına eklendi. Numune oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra, 6000 × g'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA elüsyonu gerçekleştirildi. Ardından 100 µL Buffer AE kullanılarak ikinci bir elüsyon yapıldı ve bu sayede son DNA konsantrasyonu elde edilerek PCR analizine hazır hale getirildi

3.6.3. DNA İzolasyon Saflığı:

DNA izolasyonunun saflığını sağlamak için iki belirleme yöntemi kullanıldı: NanoDrop spektrofotometresi ve jel elektroforezi. NanoDrop analizi için, 1 µL distile su kullanılarak bir boş ölçüm hazırlandı ve bu işlem, temel absorbans değerinin oluşturulmasına olanak sağladı. Kontaminasyonu önlemek amacıyla, ölçüm pedinin temiz bir bezle silinmesinin ardından, 1 µL DNA örneği eklendi ve dsDNA seçeneği seçildi. Bu ölçüm sonucunda, 1,8 A260/A280 oranı elde edilerek DNA'nın yüksek saflıkta olduğu gösterildi. Bu sonuç, izole edilen DNA'nın yeterli saflıkta olduğunu ve PCR gibi ileri düzey uygulamalar için uygun olduğunu doğruladı. Ek olarak, jel elektroforezi tamamlayıcı bir yöntem olarak kullanılarak DNA'nın bütünlüğü daha ileri düzeyde doğrulandı. Agaroz jeli hazırlanırken, 1,5 gram agaroz, 150 mL TAE tamponu ile karıştırıldı. Karışım, agaroz tamamen eriyene kadar yaklaşık 2 dakika boyunca mikrodalgada ısıtıldı. Mikrodalgadan çıkarıldıktan sonra, çözeltinin bir süre soğuması beklendi ve ardından 5 µL etidyum bromür boyası eklenerek, boyanın jelin içinde homojen şekilde dağılması sağlandı. Daha sonra, agaroz çözeltisi dikkatlice jel tepsisine döküldü ve örnek yükleme için havuzlar oluşturmak amacıyla bir tarak yerleştirildi. Jel, oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Jel tamamen katılaştıktan sonra, elektroforez cihazına aktarılıp jelin üzerini kaplamak için TAE tamponu eklendi. Örnekler, elektroforez sırasında göçü gözlemlemek amacıyla bromofenol mavi boyası ile karıştırıldı. Örnekler yüklendikten sonra, elektrik akımı uygulanarak örneklerin jel matrisinde göç etmeleri sağlandı. Elektroforez işleminin tamamlanmasının ardından, jel çıkarılarak görselleştirme işlemi için hazır hale getirildi ve ayrıştırma sonuçları analiz edildi.



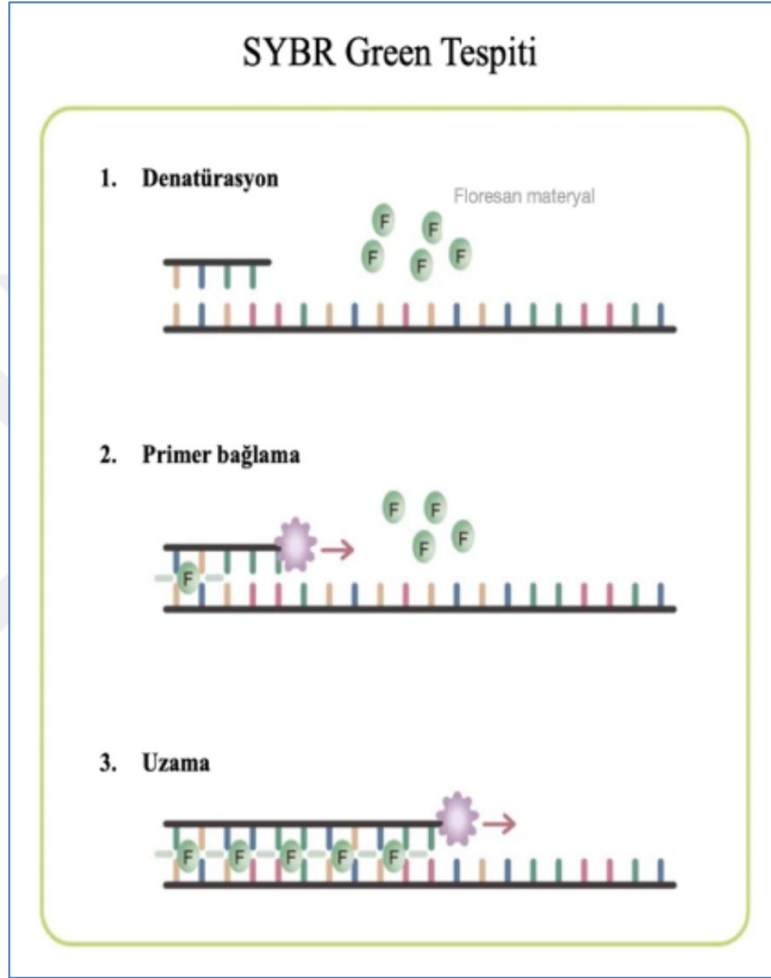
Şekil 3.10: DNA jel elektroforez görüntüsü.

Bu iki yöntem birlikte kullanılarak, elde edilen DNA'nın kalitesi konusunda güven pekiştirildi ve sonraki deneysel çalışmalar için sağlam bir temel oluşturuldu.

3.6.4. Ters Transkripsiyon Kuantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

Su, toprak, sülük dışkısı, vücut salgıları, yavru sülükler ve kokon kabukları gibi örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. RT-qPCR sürecinin başlatılması için, öncelikle RT-PCR kitinden elde edilen master karışımı PCR tüplerine aktarıldı. Daha sonra, izole edilen DNA örnekleri tüplere eklendi ve deneyin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak amacıyla negatif ve pozitif kontrol DNA örnekleri dahil edildi. Son olarak, reaksiyon hacminin uygun şekilde ayarlanması için tüplere nükleazdan arındırılmış su eklendi. Tüm bileşenler hazırlandıktan sonra, tüpler amplifikasyon için gerçek zamanlı PCR cihazına yerleştirildi. PCR süreci boyunca, tam amplifikasyonun sağlanabilmesi için döngüler dikkatle takip edildi. İlk adım, 10 dakika boyunca 95 °C'de gerçekleşen başlangıç denatürasyon aşamasıydı. Bu aşama, çift sarmallı DNA'nın hidrojen bağlarının kırılarak ipliklerin ayrılmasını sağlamak açısından kritik öneme sahipti. Amplifikasyon döngüleri, 95 °C'de 10 saniye süren denatürasyon (denaturation) aşamasıyla başladı ve bu aşama DNA ipliklerinin tamamen ayrışmasını sağladı. Daha sonra, sıcaklık 55 °C'ye düşürülerek 30 saniye süren primer bağlanma (annealing) aşamasına geçildi. Bu aşamada, primerlerin hedef DNA dizilerine spesifik olarak bağlanması sağlandı. Son olarak, dNTP'lerin DNA polimeraz tarafından eklenmesini kolaylaştırmak amacıyla sıcaklık 72 °C'ye yükseltilerek uzatma (extension) aşaması

gerçekleştirildi. Amplifikasyon süreci boyunca, reaksiyon sırasında yayılan floresans sinyalleri sürekli olarak takip edildi. Floresans yoğunluğu, örneklerde bulunan hedef DNA miktarı ile doğru orantılı olarak kaydedildi (Şekil 3.8). Deney sırasında elde edilen döngü eşiği (Ct) değerleri analiz edilerek, test edilen örneklerin HBV açısından pozitif veya negatif olduğu belirlendi. Bu analiz, örneklerde virüs varlığına ilişkin kritik bilgiler sağladı.



Şekil 3.11: SYBR Green kullanılarak gerçek zamanlı PCR aşamalarının görselleştirilmesi.

4. BULGULAR

PCR sonuçları, her numunenin üç tekrarı üzerinden elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları kullanılarak raporlandı. Son dokuz ayda, toplam 90 yavru sülük, 52 anaç sülükten başarılı bir şekilde üretilmiştir. Bu yavrular, 13 kokon içerisinde çıkmış olup, bu kokonların 10'u verimli, 3'ü ise boş olarak kaydedilmiştir. Kokonlara ait verimlilik ve yavru dağılımına ilişkin bulgular tablo halinde sunulmuştur (Tablo 4.1). Çalışma sonucunda; sülük besleme kanı, anaç sülükler, sülüklerle ilişkili numuneler, pozitif ve negatif kontrol sülüklerin ortalama HBV viral yükleri ve sonuçları ise (Tablo 4.2)'de özetlenmiştir. Anaç sülükler ve pozitif kontrol sülüğü hariç, tüm numuneler HBV RT-qPCR testlerinde negatif sonuç vermiştir. Tüm numunelere ait amplifikasyon eğrileri ve Ct değerleri ayrıca görselleştirilmiştir (Şekil 4.1).

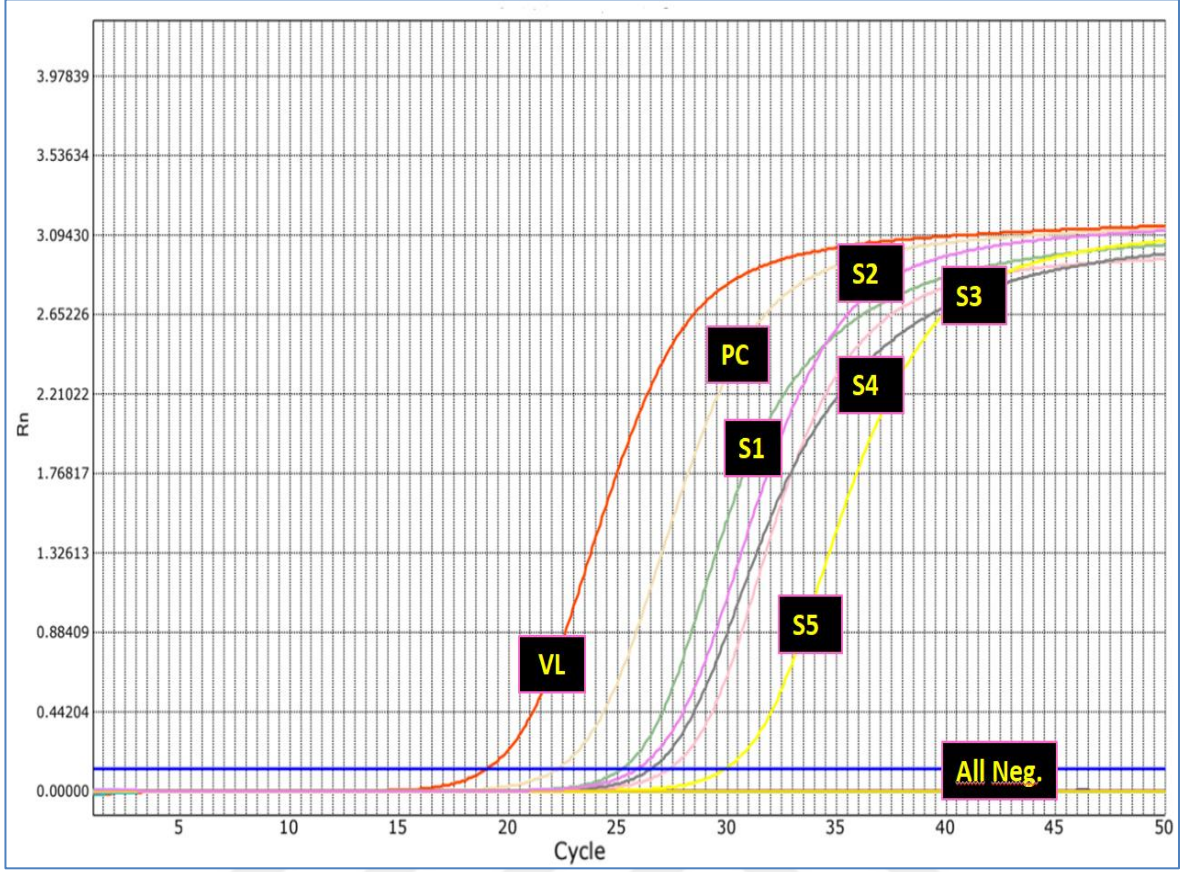
Tablo 4.1: Kokon ve yavru sayıları.

<i>Kokon</i>	<i>Yavru Sayısı</i>
<i>Kokon (1)</i>	<i>3 yavru</i>
<i>Kokon (2)</i>	<i>10 yavru</i>
<i>Kokon (3)</i>	<i>6 yavru</i>
<i>Kokon (4)</i>	<i>0 yavru</i>
<i>Kokon (5)</i>	<i>10 yavru</i>
<i>Kokon (6)</i>	<i>13 yavru</i>
<i>Kokon (7)</i>	<i>10 yavru</i>
<i>Kokon (8)</i>	<i>11 yavru</i>
<i>Kokon (9)</i>	<i>14 yavru</i>
<i>Kokon (10)</i>	<i>9 yavru</i>
<i>Kokon (11)</i>	<i>0 yavru</i>
<i>Kokon (12)</i>	<i>4 yavru</i>
<i>Kokon (13)</i>	<i>0 yavru</i>
<i>Kokon Toplamı: 13</i>	<i>Yavru Sülüğü Toplamı: 90</i>

Hepatit B virüsü için yapılan Ters Transkripsiyon Kuantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) sonuçları, tüm 90 yavru sülük, onların kokonları, su ve toprak örneklerinde negatif olarak elde edilmiştir. Buna karşın, beklenen şekilde, tüm 52 anaç sülük ve kontrol sülükleri virüs açısından pozitif sonuç vermiştir. Ancak, bu sülüklerin tükürük, toprak, dışkı ve su örnekleri negatif çıkmıştır. Tüm örneklerde, kitin doğru çalıştığından emin olmak ve sonuçların doğruluğunu teyit etmek amacıyla iç kontrol yapılmıştır.

Tablo 4.2: Örnek tipleri ve bunlara ait HBV RT-qPCR sonuçları.

Sülükler ve İlişkili Örnekler	Örnek Sayısı	Ortalama Konsantrasyon (IU/mL)	Sonuç
Beslenme Kanının Viral Yüğü	1	$6,5 \times 10^5$	Pozitif
PC (Pozitif Kontrol Sülüğü)	1	$1,078 \times 10^4$	Pozitif
Anaç Sülükler	5	$3,3 \times 10^3$	Pozitif
Anaç Sülüklerinin Yaşam Alanları: Su ve Toprak Örnekleri	5	<10	Negatif
Anaç Sülüklerinin Dışkıları	5	<10	Negatif
Anaç Sülüklerinin Vücut Yüzeyi Salgıları	5	<10	Negatif
Yavru Sülükler	90	<10	Negatif
Kokon Kabukları	13	<10	Negatif
Negatif Kontrol Sülüğü	1	<10	Negatif



Şekil 4.1: Tüm Örneklerin Amplifikasyon Eğrileri ve Ct Değerleri; **VL (Beslenme Kanının Viral Yüğü):** Sülüklerin beslenmesinde kullanılan HBV ile enfekte kanın amplifikasyon eğrisi. **PC (Pozitif Kontrol Sülüğü):** Pozitif kontrol olarak kullanılan sülükte tespit edilen HBV amplifikasyon eğrisi. **S1, S2, S3, S4, S5 (Anaç Sülükler):** Anaç sülüklerden alınan örneklerin amplifikasyon eğrileri. **All Neg (Tüm Negatif Numuneler):** Su, toprak, sülük dışkısı, vücut salgıları, yavru sülükler, kokon kabukları ve negatif kontrol sülüğünden alınan örneklerin amplifikasyon eğrileri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sülükler, farklı türleri ve dünya çapındaki çeşitli kıtalarda bulunmalarıyla dikkat çeken canlılar arasında yer almaktadır. Bu ektoparazitler, kara, tatlı su ve deniz ortamları da dahil olmak üzere çok çeşitli ekosistemlerde yaşamlarını sürdürebilmektedir (88). Sülüklerin böylesine geniş bir çevresel dağılıma sahip olması, onların doğadaki ekolojik dengenin korunmasında ve biyolojik çeşitliliğin devamlılığında oynadığı önemli rolü bir kez daha gözler önüne sermektedir. Bu durum, sülüklerin sadece kendi ekosistemleri içinde değil, aynı zamanda genel çevre sağlığının korunmasında da büyük bir katkı sunduğunu açıkça ortaya koymaktadır (89). Sülükler, yalnızca çevrenin korunmasına katkı sağlamakla kalmamış, aynı zamanda hem insanlar hem de hayvanlar için birçok hastalığın tedavisinde kullanılan önemli terapötik özellikler sunarak tıp alanında da büyük bir rol oynamıştır. Bu benzersiz tedavi edici özellikleri nedeniyle, sülükler çok eski çağlardan beri farklı medeniyetler tarafından sağlık amaçlı kullanılmış ve günümüzde de bu kullanım devam etmektedir (6).

Tarih boyunca sülüklerin vücuda uygulanmasıyla ortaya çıkan iyileştirici etkilerin altında yatan mekanizma uzun süre anlaşılamamış, bilim insanları bu sürecin kaynağını tam olarak açıklayamamıştır. Ancak, 19. yüzyılın sonlarına doğru gerçekleştirilen bilimsel araştırmalar, sülüklerin salgıladığı tükürük içerisinde biyolojik olarak aktif birçok maddenin bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu keşifler, sülüklerin tarihsel olarak çeşitli tedavi amaçlarıyla kullanıldığına dair bilgiyi desteklemekte ve günümüzde de bu kullanımın devam ettiğini göstermektedir (90). Birçok güncel çalışma, hirudoterapinin osteoartrit, omurga ağrıları, varis, diyabetik ayak, priapizm, kompleks bölgesel ağrı sendromu, hematomlar ve periferik arter hastalığı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve ağrının hafifletilmesinde önemli bir etkiye sahip olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, yapılan araştırmalar, hirudoterapinin diğer bazı tedavi yöntemlerine kıyasla daha yüksek bir etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Örneğin, lateral epikondilit tedavisinde yaygın olarak kullanılan topikal diklofenaktan daha etkili olduğu kanıtlanmış, diz osteoartriti olan hastalarda transkütanöz elektriksel sinir stimülasyonuna (TENS) kıyasla daha üstün

sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, kronik bel ağrısı tedavisinde fizik tedaviye oranla daha belirgin bir ağrı azalması ve fonksiyonel iyileşme sağladığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, hirudoterapinin çeşitli kas-iskelet sistemi rahatsızlıklarının tedavisinde güvenilir ve etkili bir tamamlayıcı veya alternatif yöntem olabileceğini göstermektedir (91).

Tıbbi sülükler, içerdiği ağrı kesici ve anti-enflamatuar özelliklere sahip bileşenler, antikoagülanlar, trombosit inhibitörleri, antimikrobiyal maddeler ve hücre dışı matris bozucu enzimler sayesinde egzama, viral hepatit, romatizmal hastalıklar, diş eti ağrıları ve fitık gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde ve yara iyileşme süreçlerinde önemli bir rol oynamıştır (92). Bu biyolojik bileşenlerin keşfiyle birlikte, söz konusu aktif maddelerin laboratuvar ortamında izole edilerek eczacılık alanında kullanılması yönünde çeşitli bilimsel çalışmalar başlatılmıştır.

Geçmişten günümüze, tıbbi araştırmalar ve bilimsel çalışmalar kesintisiz olarak sürdürülmüş, bu süreçte birçok yeni biyolojik madde keşfedilmiş ve modern tıbbın gelişimine katkı sağlamak amacıyla araştırılmaya devam edilmiştir. Günümüzde yürütülen bu çalışmalar, sülüklerin farmakolojik potansiyelinin tam anlamıyla anlaşılması ve daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından büyük bir bilimsel öneme sahiptir (90).

Türkiye Cumhuriyeti'nde, Sağlık Bakanlığı 2014 yılında Resm Gazete'de yayımlanan "Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği" başlıklı bir düzenleme ile hirudoterapinin doğru ve uygun şekilde uygulanmasına yönelik standartları belirlemiş ve kullanım kriterlerini birleştirmiştir. Bu yönetmelik kapsamında, tedavi sırasında kullanılan tıbbi sülüklerin tek kullanımlık olarak kabul edilmesi ve her uygulamadan sonra tekrar kullanılmaksızın güvenli bir şekilde bertaraf edilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Yönetmeliğe göre, sülüklerin kullanım sonrasında tıbbi merkezler tarafından uygun imha yöntemleriyle yok edilmesi zorunlu tutulmuş olup, bu uygulamanın temel amacı, hirudoterapi sonrası olası enfeksiyon risklerini önlemek ve hastalar arasında bulaşıcı hastalıkların yayılmasını engellemektir (93). Bununla birlikte, tıbbi ve ticari alanlardaki aşırı ve kontrolsüz kullanımlar, sülük popülasyonlarının doğal yaşam alanlarında ciddi şekilde azalmasına yol açmış ve bu durum ekolojik dengenin bozulmasına neden olarak bazı türlerin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmasına sebebiyet vermiştir (94).

Tıbbi amaçlarla sülük uygulamalarının hijyen ve sterilizasyon kurallarına uyulmadan rastgele gerçekleştirilmesi, çeşitli yan etkilere yol açarak bireyler arasında hastalıkların

yayılmasına neden olabilmektedir. Sülük tedavisinin belirli faydalar sağladığı bilinmekle birlikte, konakçıya bulaşarak ciddi sağlık sorunlarına neden olabilecek patojenleri taşıdığı da tespit edilmiştir. Bu patojenler arasında *Klebsiella pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Aeromonas* spp., *Serratia* sp., *Proteus* sp. ve *Vibrio* sp. gibi bakteriler, *Trypanosoma* ve *Toxoplasma* gibi parazitler ile HIV, Hepatit B ve Hepatit C gibi virüsler yer almaktadır (95). Bu mikroorganizmalar, tedavi sürecinin etkinliğini azaltmanın yanı sıra ciddi enfeksiyonlara da yol açabilmektedir. Bu nedenle, sülük uygulamaları sırasında sıkı hijyen kurallarına uyulmalı, sterilizasyon önlemleri eksiksiz bir şekilde uygulanmalı ve her kullanım sonrasında sülükler imha edilerek farklı bireylere bulaşma riski ortadan kaldırılmalıdır. Gerekli önlemler alınmadığında, sülüklerin taşıdığı enfeksiyon etkenleri bireyler arasında yayılabilir ve tedavi süreci beklenenden daha fazla sağlık riskine neden olabilir (93).

Bu çalışmada, hirudoterapi uygulamaları sırasında enfekte bireyler üzerinde kullanılan sülüklerin, imha edilmeden önce üreme süreçlerinde yeniden değerlendirilme olasılığına yönelik olarak, virüslerin anaç sülüklerden yavrularına geçiş potansiyelini araştıran deneysel bir çalışma yürütüldü. Araştırma kapsamında, model organizma olarak Hepatit B virüsü (HBV) tercih edilmiş ve bu etkenin sülüklerde nesiller arası bulaşma durumu değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, çalışmada kullanılan örnekler çerçevesinde, HBV'nin anaç sülüklerden yavrulara geçişine dair herhangi bir bulguya ulaşamadığını göstermiştir. Ayrıca, çevresel örneklerde gerçekleştirilen moleküler analizler sonucunda da HBV'ye ait pozitif bir tespit yapılmamıştır. Ancak, bu sonuçların daha kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır (Tablo 4.2, Şekil 4.1).

Bu bulgular, tıbbi sülüklerin kontrollü koşullar altında yeniden kullanımı ve üreme döngüsünün sürdürülebilirliği açısından önemli bilimsel veriler sunmaktadır. Ancak, sülüklerin potansiyel patojen taşıyıcılığı göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen sonuçların farklı viral ve mikrobiyal ajanlar açısından da doğrulanması gerekmektedir. Özellikle bu çalışmada kullanılan viral patojenin Hepatit B Virüsü (HBV) olduğu dikkate alındığında, HBV'nin sülüklerdeki kalıcılığı ve yavrulara geçiş mekanizmalarının daha ayrıntılı biçimde araştırılması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, uygulamaların klinik ortamlarda güvenle gerçekleştirilebilmesi için, yavru sülüklerde HBV bulunmadığından emin olunmasına yönelik, incelenmesi gereken sülük sayısının belirlenmesine dair ileri düzey çalışmalar yürütülmelidir. Bu kapsamda yapılacak araştırmalar, hirudoterapinin hem tıbbi güvenliği hem de ekolojik sürdürülebilirliği açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

Sülük bağışıklık sistemi, hem hücresel hem de humoral bileşenlerden oluşan karmaşık bir savunma mekanizmasına sahiptir. Yapılan araştırmalar, sülüklerin diğer halkalı solucanlar gibi coelomocyte adı verilen bağışıklık hücrelerine sahip olduğunu ve bu hücrelerin omurgalılarıdaki öldürücü T hücrelerine benzer şekilde işlev gördüğünü ortaya koymuştur. Coelomocyte hücreleri, yabancı toksinleri tanıyıp hücre duvarındaki glikoproteinler aracılığıyla yok ederek enfeksiyonlara karşı korunmada kritik bir rol üstlenir. Bunun yanı sıra, tıbbi sülüklerde bağışıklık yanıtında doğrudan rol oynayan NK (doğal katil) hücreleri ve CD8+ hücreleri tespit edilmiştir. Bu hücreler, iltihaplanma sürecine katkıda bulunarak enfeksiyonlara ve yabancı maddelere karşı bağışıklık sisteminin etkinliğini artırmaktadır. Hücre aracılı bağışıklık tepkisinin yanı sıra, sülük bağışıklık sistemi antijen bağlayıcı proteinler, sitokinler ve antibakteriyel maddeler gibi çeşitli bileşenler içermektedir. Bu bileşenler, sölomik sıvıyı güçlendirerek hem lizis hem de aglütinasyonu teşvik etmekte, dolayısıyla bağışıklık yanıtının etkinliğini artırmaktadır. Özellikle sölomik sitolitik faktör (CCF)'ün, omurgalıların tümör nekroz faktörüne (TNF) benzer işlevlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, sülüklerin bağışıklık sisteminde yer alan eisenapore, lysenin ve fetidin gibi pore-forming proteinler, hedef hücrelerin dış zarlarını parçalayarak bağışıklık sisteminin yabancı hücelere karşı etkili bir savunma oluşturmasını sağlamaktadır. Bu proteinlerin işlevi, omurgalı bağışıklık sistemindeki perforin ve granzim mekanizmalarına benzerlik göstermektedir. Sülük bağışıklık sistemi ayrıca kozmik mitojenik faktör (CMF) adı verilen bir bileşene sahiptir. CMF, fosfolipaz aktivitesi yoluyla antibakteriyel etkinlik göstererek bakteriyel enfeksiyonlara karşı güçlü bir savunma sağlamaktadır. Bu mekanizmaya fosfolipaz inhibitörleri de katkıda bulunarak bağışıklık yanıtının etkinliğini artırmaktadır. Bununla birlikte, sülüklerin bağışıklık sistemi yalnızca enfeksiyonlara karşı koruma sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda bağışıklık tepkisinin uzun vadeli düzenlenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır (96).

Ayrıca, antimikrobiyal peptitler (AMP) de sülüğün bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Bu peptitler, toksinleri nötralize eder ve bağışıklık yanıtını güçlendirir. Özellikle thromocin, lumbricin ve hirudomacin gibi AMP'ler, bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede kritik rol oynar. Bu moleküller, sülüğün bağışıklık savunmasını daha etkili hale getirir, yabancı maddelere karşı etkin bir koruma sağlar ve bağışıklık tepkilerini düzenler (96).

Afrika domuz vebası virüsünün (ASFV) sülüklerde ne kadar süre aktif kalabildiğini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, çeşitli sülük türleri seçilmiş ve dış

etkenlerin araştırma sonuçlarını etkilemesini önlemek amacıyla bu sülükler laboratuvar ortamında kontrollü koşullar altında tutulmuştur. Çalışmanın sonraki aşamasında, ASFV ile enfekte olduğu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle doğrulanan domuzlardan kan örnekleri toplanmıştır. Enfeksiyonun varlığı ve kandaki virüs seviyeleri kesin olarak belirlendikten sonra, elde edilen kan örnekleri özel besleme tüpleri aracılığıyla sülüklere verilerek enfekte edilmeleri sağlanmıştır. Deney sürecinde, sülükler belirlenen farklı zaman dilimlerine göre gruplara ayrılmış ve kan ile beslenmelerinin ardından belirli zaman noktalarında toplanmıştır. Örneklem zaman noktaları, beslemeden sonra 1. gün, 7. gün, 14. gün ve 30. gün olarak belirlenmiştir. Toplanan sülükler iki farklı yöntemle analiz edilmiştir. İlk yöntemde, sindirim sistemi dokuları incelenerek virüsün varlığı değerlendirilmiş; ikinci yöntemde ise, sülüklerin vücutlarında kalan kan kalıntılarında virüsün genetik materyalini tespit etmek amacıyla kantitatif PCR (qPCR) yöntemi kullanılmıştır. Bu analizler, ASFV'nin sülük organizması içerisinde ne kadar süre boyunca tespit edilebilir olduğu ve potansiyel vektörlük kapasitesine dair önemli veriler sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar, ASFV'nin sülüklerin sindirim sisteminde en az 30 gün boyunca aktif kalabildiğini, ancak zaman geçtikçe virüs seviyelerinde belirgin bir düşüş gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Virüsün sülüğün bağırsaklarında varlığını sürdürebildiği ancak burada çoğalamadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, virüsün bulaşıcılığını koruduğu ve potansiyel olarak epidemiyolojik bir risk teşkil ettiği sonucuna varılmıştır. Özellikle, sülüklerin beslenme sırasında kusması veya doğrudan ısırıkları yoluyla virüsün yayılma ihtimali olduğu belirlenmiştir (97).

Başka bir çalışmada, araştırmacılar *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüğü kullanarak Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) gibi virüslerin sülüğün bağırsaklarında aktif kalıp kalamayacağını ve enfeksiyöz özelliklerini koruyup koruyamayacağını incelemeyi amaçlamıştır. Bu kapsamda, sülükler BVDV ile enfekte sığır kanı ile beslenmiş ve 20 °C sıcaklıkta tutulan standart laboratuvar koşullarında yedi ay boyunca gözlemlenmiştir. Çalışmanın bulguları, BVDV viral yükünün üç ay sonunda belirgin bir şekilde azaldığını ortaya koymuştur. Ayrıca, Murine Parvovirus ve Reovirus gibi diğer viral patojenlerin seviyelerinin dört ay içinde tespit edilemez düzeye indiği gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, sülüğün bağırsak florasında doğal olarak bulunan *Aeromonas hydrophila veronii* gibi bazı simbiyotik bakterilerin, viral patojenlerin etkisiz hale getirilmesinde ve viral yükün azaltılmasında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, tıbbi sülüklerin viral patojenleri taşıma potansiyelini anlamaya yönelik ileri araştırmalar için önemli bir temel

oluşturmakta ve simbiyotik mikroorganizmaların patojen eliminasyonundaki olası rollerine işaret etmektedir (98).

Farklı bir çalışmada ise, 10 ila 30 °C arasındaki sıcaklık seviyelerinin virüslerin inaktivasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, incelenen virüsler arasında Bovine Parvovirus, Feline Calicivirus, Equine Herpesvirus Tip 1 ve Equine Arteritis Virus gibi farklı hayvan virüsleri bulunmaktadır. Araştırmanın sonuçlarına göre, 10 °C'de sıcaklıkta saklanan sülüklerdeki virüslerin tespit edilebilirliğinin 23 ila 29 hafta arasında değişen bir süre zarfında ortadan kalktığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, sıcaklığın 30 °C'ye yükseltilmesiyle bu sürelerin daha da kısaldığı gözlemlenmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular, 20 °C'nin sülüklerin sindirim süreçlerini en verimli şekilde gerçekleştirebilmeleri ve hastalık risklerini en aza indirebilmeleri açısından en uygun sıcaklık olduğunu ortaya koymuştur. Bunun temel nedeni, 20 °C'nin sülüklerin doğal yaşam koşullarına en yakın sıcaklık olmasıdır. Bu uygun sıcaklık seviyesi, sülüklerin fizyolojik işlevlerini sağlıklı ve dengeli bir şekilde sürdürebilmelerini sağlamaktadır (98). *Plasmodium berghei*, *Trypanosoma brucei* ve *Toxoplasma gondii* gibi parazit türlerinin yanı sıra çeşitli bakteri türlerinin de tıbbi sülüğün bağırsaklarında hayatta kalma süreleri üzerine bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında sülükler, 3 °C ile 32 °C arasında değişen sıcaklık koşullarında tutulmuş ve elde edilen bulgular sonucunda, bu mikroorganizmaların sülüklerin sindirim sisteminde en az 6 ay boyunca canlı kalabildiği belirlenmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan ayrıntılı incelemelerde, bu parazitlerin ve bakterilerin sülüğün tükürük bezlerine veya üreme organlarına geçiş yapmadığı tespit edilmiştir. Ancak, araştırma aynı zamanda, sülüğün enfekte bireylerden emdiği kan yoluyla bu patojenleri sindirim sisteminde taşıyabileceğini ve dolayısıyla dolaylı yoldan bir konakçıdan diğerine bulaştırma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum özellikle HIV, HBV, *Toxoplasma gondii* ve *Plasmodium berghei* gibi enfeksiyon hastalıklarının yaygın olduğu bölgelerde halk sağlığı açısından önemli riskler teşkil edebileceğini göstermektedir (99).

Önceki araştırmalarda, sülüklerin bağırsak florasında bulunan bakteriler, parazitler ve virüsler gibi çeşitli patojenlerin organizma üzerindeki etkileri ve çevresel faktörlerden nasıl etkilendiği incelenmiştir. Bu çalışmalar, özellikle sıcaklık değişimleri ve patojenlerin sülük organizmasında kalma süreleri gibi etkenlerin bağışıklık mekanizmaları üzerindeki rolüne ışık tutmuştur. Ancak, bu araştırmalar patojenlerin anaç sülüklerden yavrularına doğrudan geçişi konusunda kesin bir bulgu sunmamıştır. Bununla birlikte, çevresel faktörlerin

patojen yükü üzerindeki etkilerini anlamak açısından önemli bir temel oluşturmuşlardır. Literatürde, düşük sıcaklık koşullarının ve simbiyotik mikroorganizmaların varlığının patojenlerin etkinliğini ve miktarını azalttığı, dolayısıyla hastalık yapıcı organizmaların zayıflamasına neden olduğu ifade edilmektedir. Bu durum, patojenlerin çevreye salınımını azaltarak hastalıkların yayılmasını önlemenin yanı sıra, sülüklerin ekolojik ortamında viral güvenliğin artırılmasına da katkı sağlamaktadır.

Bu bağlamda, *Hirudo verbana* türü sülükler üzerinde gerçekleştirilen deneyler, belirli virüslerin, özellikle hepatit virüslerinin, anaç sülüklerden yavrularına geçiş yapmadığını doğrulamıştır. Bu bulgu, insanlardan hayvanlara bulaşabilen bazı patojenlerin sülüklerde nesiller arası aktarımının sınırlı olabileceğini göstermektedir ve mevcut literatürle uyumludur. Literatürde, parazitik veya simbiyotik ilişkiler içinde bulunan bazı organizmalarda da benzer mekanizmaların bulunduğu bildirilmiştir. Ancak, elde edilen veriler, virüslerin neden yavru sülüklere bulaşmadığına dair temel mekanizmanın henüz tam olarak anlaşılamadığını ortaya koymaktadır.

Sülüklerin patojenleri nesillerine aktarmamasının biyolojik veya fizyolojik bir bariyer ile mi ilişkili olduğu, bağışıklık sistemlerinin bu süreçte nasıl bir rol oynadığı gibi konular henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Mevcut bulgular, sülüklerin bağışıklık sisteminin virüsleri doğrudan ortadan kaldırıp kaldırmadığı veya organizma içerisinde etkisiz hale getirip getirmediği gibi önemli soruların yanıtlanmasını gerektirmektedir. Bu süreçlerin aydınlatılması, yalnızca sülük popülasyonlarının korunması açısından değil, aynı zamanda insanlarda anneden fetüse geçen viral hastalıkların önlenmesine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirmek açısından da büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın dikkat çekici bulgularından biri, sülüklerde nesiller arası patojen aktarımının gözlemlenmemiş olmasıdır. Bu durum, belirli koşullar altında tıbbi amaçla kullanılan sülüklerin her uygulama sonrası rutin olarak imha edilmesinin yeniden değerlendirilmesine zemin hazırlayabilir. Literatürdeki mevcut verilerle uyumlu olan bu bulgu, etik, ekonomik ve ekolojik açılardan daha sürdürülebilir uygulamaların geliştirilmesine katkı sağlayabilecek potansiyel bir adım olarak değerlendirilebilir.

Tıbbi sülüklerin her kullanımdan sonra imha edilmesi, popülasyonların sürdürülebilirliği açısından baskı oluşturmakta ve aynı zamanda ekonomik açıdan önemli maliyetlere yol açmaktadır. Bu doğrultuda, gelecekte sülüklerin bağışıklık sistemlerinin viral patojenlere karşı yanıtlarını detaylı biçimde inceleyen çalışmaların yürütülmesi büyük önem

taşımaktadır. Böyle bir yaklaşım, yalnızca sülük biyolojisine ilişkin bilgi birikimini artırmakla kalmayacak, aynı zamanda biyomedikal alanda viral enfeksiyonların önlenmesine veya tedavisine yönelik yenilikçi stratejilerin geliştirilmesine katkı sunabilecek yeni bilimsel perspektifler kazandıracaktır. Özellikle, viral etkenlerin nesiller arası aktarımını engelleyen biyolojik mekanizmaların aydınlatılması, bağışıklık sisteminin doğal bariyerleri hakkında değerli bilgiler sağlayabilir.

Ayrıca, sülüklerin viral patojenleri etkisiz hale getirme süreçlerine dahil olan simbiyotik bakteriler üzerine yapılacak araştırmalar, tıp alanında yeni probiyotik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir. *Aeromonas hydrophila veronii* gibi bakterilerin viral patojenlerin etkisini azaltmada oynadığı rol, biyomedikal alanda yeni araştırmalara yön verebilir. Bu tür mikroorganizmaların patojen eliminasyonundaki etkilerinin anlaşılması, yalnızca veteriner tıpta değil, insan sağlığında da enfeksiyon önleme stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Gelecekte yapılacak araştırmalar, sülüklerin bağışıklık sisteminin patojenlerle nasıl başa çıktığını ve viral patojenlerin neden yavrulara aktarılmadığını daha ayrıntılı bir şekilde açıklığa kavuşturmalıdır. Bu bulgular, yalnızca sülük biyolojisi açısından değil, insan bağışıklık sisteminin evrimi ve viral enfeksiyonların önlenmesi açısından da yeni bilgiler sağlayabilir. Özellikle, sülükler gibi dış konakçılarda viral patojenlerin kalıcılığı ve aktarım mekanizmalarının anlaşılması, bağışıklık sistemine yönelik yeni ilaçların geliştirilmesine ve hastalıkların bulaş zincirinin kırılmasına katkıda bulunabilir.

Sonuç olarak, bu araştırma, biyomedikal bilimler, ekolojik sürdürülebilirlik ve etik hayvan kullanımı gibi çeşitli disiplinlerde değerli bilgiler sağlayarak, hem tıbbi sülüklerin korunması hem de tıp alanındaki yenilikçi yaklaşımlar için güçlü bir bilimsel temel oluşturmuştur. Gelecekte yapılacak daha kapsamlı çalışmalar, hem sülüklerin biyolojisini hem de bağışıklık sistemlerinin çalışma prensiplerini daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lemke S, Vilcinskas A. European medicinal leeches—new roles in modern medicine. *Biomedicines*. 2020;8(5):99.
2. Das BK. An overview on hirudotherapy/leech therapy. *Ind Res J Pharm Sci*. 2014;1(1):1-11.
3. Öztürk YE, Dömbekci HA, Seda Ü. Geleneksel Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Kullanımı. *Bütünleyici ve Anadolu Tıbbı Derg*. 2020;1(3):23–35.
4. Wollina U, Heinig B, Nowak A. Medical leech therapy (Hirudotherapy). *Our Dermatology Online/Nasza Dermatologia Online*. 2016;7(1).
5. Ma C-J, Li X, Chen H. Research progress in the use of leeches for medical purposes. *Tradit Med Res*. 2021;6:56–69.
6. Itrat M, Zarnigar HN, Hague N. Historical aspects of leech therapy: a critical review. *Int J Heal Sci Res*. 2013;3(7):78–83.
7. Frazier E. *Leech Therapy*. Effland A, editor. *Science, Technology and Society: A Student Led Exploration*. Clemson, SC: Pressbooks; 2020.
8. Younis Munshi IA, Rafique H, Ahmad Z. Leeching in the history-a review. *Pakistan J Biol Sci*. 2008;11(13):1650–1653.
9. Martucci, J. Medicinal leeches and where to find them. *Science History Institute* [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 18 Ağustos 2024]. Erişim adresi: <https://www.sciencehistory.org/stories/magazine/medicinal-leeches-and-where-to-find-them/>
10. Sig AK, Guney M, Uskudar Guclu A, Ozmen E. Medicinal leech therapy—an overall perspective. *Integr Med Res*. 2017;6(4):337–343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imr.2017.08.001>

11. Singh AP. Medicinal leech therapy (Hirudotherapy): A brief overview. *Complement Ther Clin Pract*. 2010;16(4):213–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctcp.2009.11.005>
12. M. Abdualkader A, Merzouk A, Ghawi AM, Alaama AM. Some Biological Activities of Malaysian Leech Saliva Extract. *IIUM Eng J*. 2011;12(4) :1–9.
13. Orevi M, Rigbi M, Eldor A. Platelet-Aggregating Inhibitory Agents from Leech Saliva and Pharmaceutical Preparations Containing the Same. 1989.
14. Lemke S, Vilcinskas A. European medicinal leeches-New roles in modern medicine. *Biomedicines*. 2020;8(5):1–12.
15. Wüstenhagen DA, Lukas P, Müller C, Aubele SA, Hildebrandt JP, Kubick S. Cell-free synthesis of the hirudin variant 1 of the blood-sucking leech *Hirudo medicinalis*. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76715-w>
16. Nair HKR, Ahmad NW, Lee HL, Ahmad N, Othamn S, Mokhtar NSHM, et al. Hirudotherapy in Wound Healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2020;1–7.
17. Faleh, N., Hassan, Z. N., and Shafeeq, M. A. A. (2019). Leeches review: biology, ecology and medical important. *Indian Journal of Public Health*, 10(10), 3275–3279.
18. Utku, G. İç Sular Zoo Bentozu 4.Ders [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 18 Ağustos 2024]. Erişim adresi: <https://slideplayer.biz.tr/slide/12320293/>.
19. Phillips AJ, Govedich FR, Moser WE. Leeches in the extreme: Morphological, physiological, and behavioral adaptations to inhospitable habitats. *Int J Parasitol parasites Wildl*. 2020;12:318–325.
20. Mann KH. Leeches (Hirudinea): their structure, physiology, ecology and embryology. Vol. 11. Elsevier; 2013.
21. Taxonomy Browser - NCBI - NLM [Internet]. [Erişim Tarihi 18 Ağustos 2024]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=55824>
22. *Macrobdella decora* - Wikipedia [Internet]. [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi: https://en.wikipedia.org/wiki/Macrobdella_decora
23. Tiger Leech (*Richardsonianus australis*) - Minibeast Wildlife Bug Shop [Internet]. [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi:

- <https://shop.minibeastwildlife.com.au/tiger-leech-richardsonianus-australis/>
24. *Hirudo troctina* | Flickr [Internet]. [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi: <https://www.flickr.com/photos/8793530@N03/albums/72157622761786882/>
 25. Jeratthitikul E, Jiranuntskul P, Nakano T, Sutjarit J, Panha S. A new species of buffalo leech in the genus *Hirudinaria* Whitman, 1886 (Arhynchobdellida, Hirudinidae) from Thailand. *ZooKeys*. 2020;933:1-14. doi:10.3897/zookeys.933.49314.
 26. Ozark Highlands Leech (*Macrobdella diplotertia*) · iNaturalist [Internet]. [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi: <https://www.inaturalist.org/taxa/224294-Macrobdella-diplotertia>
 27. Information about leeches - R&M Lupton leeches - medical leech supplier [Internet]. [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi: <https://leeches-nz.co.nz/information-about-leeches/>
 28. Wang H, Meng FM, Jin SJ, Gao JW, Tong XR, Liu ZC. A new species of medicinal leech in the genus *Hirudo* Linnaeus, 1758 (Hirudiniformes, Hirudinidae) from Tianjin City, China. *ZooKeys*. 2022;1095:83–96. doi:10.3897/zookeys.1095.74071.
 29. The Biodiversity of Singapore- *Hirudinaria bpling* [Internet]. 2012 [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi: <https://singapore.biodiversity.online/species/A-Anne-Clit-Hirudinea-000006>
 30. *Macrobdella ditetra* · iNaturalist [Internet]. [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi: <https://www.inaturalist.org/taxa/224295-Macrobdella-ditetra>
 31. Aguilar R. *Macrobdella mimicus*. Horseshoe Swamp, American Chestnut Land Trust, Prince Frederick, Calvert County, MD | Flickr [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi: https://www.flickr.com/photos/serc_biodiversity/42233396575/
 32. Poly WJ, felipe. Range Extension for the Elusive New England Medicinal Leech, *Macrobdella sestertia* Whitman, 1886 (Hirudinida: Macrobdellidae), in South Carolina, U.S.A., with Notes on Morphology, Coloration, and Biology. Plazi.org taxonomic treatments database [Internet]. 2018[Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi: <https://www.gbif.org/dataset/f83f6d92-e0e1-413e-bf9d-68b7864cadaf>
 33. 참거머리(*Hirudo nipponia* (Whitman, 1886)) : 네이버 블로그 [Internet]. 2009 [Erişim

Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi:
<https://blog.naver.com/PostView.nhn?isHttpsRedirect=true&blogId=nstdaily&logNo=150049216521>

34. Sağlam N. Internal and External Morphological Characteristics of the Medicinal Leech Species *Hirudo sulukii* and *Hirudo verbana*. *Türkiye parazitolojii Derg* [Internet]. 2019;43(4):204–209.
35. Sawyer RT. Why we need to save the medicinal leech. *Oryx*. 1981;16(2):165–168.
36. Uğural B, Serezli R, Hamzaçebi S, Çiftçi H. *Medical Applications of Medicinal Leeches and Its Breeding Techniques* [Poster]. The 4th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences. Mart 2018; Kumamoto, Japan
37. Kumar M, Manju R. Leech Farming in Natural Habitat: An Observational Report. *AYUHOME*. 2020;7(1):15–19.
38. Ebied A-BM, Issa AA, Awad MFAA. Micro Flora Associated with Freshwater Medicinal Leeches in Taif City, Saudi Arabia. *Annu Res Rev Biol*. 2018;25(5):1–14.
39. Abdullah S, Dar LM, Rashid A, Tewari A. Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch Clin Exp Surg*. 2012;1(3):172–180.
40. Parker JL, Shaw JG. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *J Infect*. 2011;62(2):109–118.
41. Eldor A, Orevi M, Rigbi M. The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Rev*. 1996;10(4):201–209.
42. Baskova IP, Kostjukova ES, Vlasova MA, Kharitonova O V., Levitskiy SA, Zavalova LL, et al. Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis*. *Biochem*. 2008;73(3):315–320.
43. Orevi M, Rigbi M, Eldor A. Platelet-aggregating inhibitory agents from leech saliva and pharmaceutical preparations containing the same. Google Patents; 1993.
44. Ayhan H, Mollahaliloğlu S. Medicinal leech therapy: hirudotherapy. *Ankara Med J*. 2018;18(1):141–148.
45. Rai P, Singh O, Dwivedi A, Singh A, Rai N. Efficacy of leech therapy in the

- management of osteoarthritis (Sandhivata). *AYU (An Int Q J Res Ayurveda)*. 2011;32(2):213–217.
46. Ayhan H, Mollahaliloğlu S. Tıbbi sülük tedavisi: Hirudoterapi. *Ankara Med J*. 2018;18(1):141–148.
 47. Pietrzak A, Kanitakis J, Tomasiewicz K, Wawrzycki B, Kozłowska-Loj J, Dybiec E, et al. Cutaneous complications of improper leech application. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19(4).
 48. Wells MD, Manktelow RT, Brian Boyd J, Bowen V. The medical leech: an old treatment revisited. *Microsurgery*. 1993;14(3):183–186.
 49. Aydın A, Nazik H, Kuvat SV, Gurler N, Ongen B, Tuncer S, et al. External decontamination of wild leeches with hypochloric acid. *BMC Infect Dis*. 2004;4:1–8.
 50. Mumcuoglu KY, Huberman L, Cohen R, Temper V, Adler A, Galun R, et al. Elimination of symbiotic *Aeromonas* spp. from the intestinal tract of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, using ciprofloxacin feeding. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(6):563–567.
 51. Deganc M, Zdravic F. Venous congestion of flaps treated by application of leeches. *Br J Plast Surg*. 1960;13:187–192.
 52. Whitaker IS, Oboumarzouk O, Rozen WM, Naderi N, Balasubramanian SP, Azzopardi EA, et al. The efficacy of medicinal leeches in plastic and reconstructive surgery: a systematic review of 277 reported clinical cases. *Microsurgery*. 2012;32(3):240–250.
 53. Grassberger M, Sherman RA, Gileva OS, Kim CMH, Mumcuoglu KY. *Biotherapy—history, principles and practice*. Springer Dordr Heidelb New York London. 2013;37:38–39.
 54. Riede F, Koenen W, Goerdts S, Ehmke H, Faulhaber J. Medicinal leeches for the treatment of venous congestion and hematoma after plastic reconstructive surgery. *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft*. 2010;8(11):881–888.
 55. Wang H, Zhang J, Chen L. The efficacy and safety of medical leech therapy for osteoarthritis of the knee: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Surg*. 2018;54:53–61.

56. Koch CA, Olsen SM, Moore EJ. Use of the medicinal leech for salvage of venous congested microvascular free flaps of the head and neck. *Am J Otolaryngol*. 2012 Jan;33(1):26–30.
57. Nair HKR, Ahmad NW, Lee HL, Ahmad N, Othamn S, Mokhtar NSHM, et al. Hirudotherapy in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2022;21(4):425–431.
58. Kulbida R, Mathes A, Loeser J. Beneficial effects of hirudotherapy in a chronic case of complex regional pain syndrome. *J Integr Med*. 2019;17(5):383–386. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2019.05.005>
59. Koeppen D, Aurich M, Rampp T. Medicinal leech therapy in pain syndromes: A narrative review. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2014;164(5–6):95–102.
60. Düzgün G, Çelik A, Akyol A. Medical Leeches and Hirudotherapy: Where is Nurse's Role? *J Educ Res Nurs*. 2021;18(3):276–281.
61. Fattakhov NK, Normatova SA, Madaminov SM, Tilyakhodzhaeva GB, Abdulkhakimov AR. Hirudotherapy as an effective method for treatment of migraine-a disease of unknown etiology. *Int J Heal Med Sci*. 2021;4(2):232–237.
62. Image Gallery | The Leech Clinic [Internet]. [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]. Erişim adresi: <https://www.theleechclinic.com/gallery/>
63. Dwivedi AP. Case study of leech application in diabetic foot ulcer. *Int J Res Ayurveda Pharm*. 2012;3(5):748–751.
64. Abdullayeva AI, Bozhedomov AY, Pustovaya EP, Slonova VM, Karnaeva AS, Kozhevnikova LA. Application of hirudotherapy in the complex treatment of periodontal diseases. *Russ J Dent*. 2020;24(4):273–277.
65. Serekova AA, Dzgoeva MG, Dzgoeva ZG, Kokoev AB, Farnieva OA. Improving the Effectiveness of Therapeutic Measures for Generalized Periodontitis in Patients with Hypertension. *J Pharm Res Int*. 2021;33(52B):245–251.
66. <https://hacamatvesuluk.com/dis-eti-iltihabi-dis-eti-cekilmesi-tedavisi-suluk/> [Erişim Tarihi 17 Aralık 2024]
67. Parija SC. Textbook of microbiology and immunology. Berlin, Heidelberg, Germany:

Springer; 2023 Mar 16.

68. Karakus N, Yigit S, Kocak M, Bozkurt N, Duygu F. Impact of methylene-tetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for hepatitis B virus infection. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2023;42(9):683–695. <https://doi.org/10.1080/15257770.2023.2187061>
69. Tosun S, Aygün O, Özdemir HÖ, Korkmaz E, Özdemir D. The impact of economic and social factors on the prevalence of hepatitis B in Turkey. *BMC Public Health*. 2018;18(1):1–9.
70. Khungar V, Han SH. Hepatitis B. *Gut Instincts A Clin Handb Dig Liver Dis*. 2023 Jul;227–235.
71. Glebe D, Bremer C. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*. 2013;33(2):103–112.
72. Mohammed MY, Khaier MAM, Agabna N, Shaddad SA. Taurocholine Drug Design as Sodium Taurocholate Co-Transporting Polypeptide (NTCP) Inhibitor for HBV Treatment, in Silico Approach. *Saudi J Biomed Res*. 2022 Nov;7(11):291–298.
73. Min Y, Wei X, Xia X, et al. Hepatitis B virus infection: An insight into the clinical connection and molecular interaction between hepatitis B virus and host extrahepatic cancer risk. *Front Immunol*. 2023;14:1141956. Published 2023 Mar 1.
74. Pattyn J, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. Hepatitis B Vaccines. *J Infect Dis*. 2021 Oct;224(Suppl 4):S343.
75. Smith SMS, Sonogo S, Wallen GR, Waterer G, Cheng AC, Thompson P. Use of non-pharmaceutical interventions to reduce the transmission of influenza in adults: A systematic review. *Respirology*. 2015 Aug;20(6):896–903.
76. Franco MA, Greenberg HB. Rotaviruses, Noroviruses, and Other Gastrointestinal Viruses. *Goldman's Cecil Med*. 2012;2:2144.
77. Athni TS, Shocket MS, Couper LI, Nova N, Caldwell IR, Caldwell JM, et al. The influence of vector-borne disease on human history: socio-ecological mechanisms. *Ecol Lett*. 2021 Apr;24(4):829–846.

78. Megli CJ, Coyne CB. Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. *Nat Rev Microbiol* 2021 202. 2021 Aug;20(2):67–82.
79. Gaensbauer J, Grubenhoff JA. Neonatal herpes simplex virus infections: New data, old conundrum. *Pediatrics*. 2019 Apr;143(4).
80. Kalinichenko S, Komkov D, Mazurov D. HIV-1 and HTLV-1 Transmission Modes: Mechanisms and Importance for Virus Spread. *Viruses*. 2022 Jan;14(1).
81. Fongsaran C, Jirakanwisal K, Tongluan N, Latour A, Healy S, Christofferson RC, et al. The role of cofeeding arthropods in the transmission of *Rickettsia felis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(6):e0010576.
82. Crimean-Congo haemorrhagic fever [Internet]. [Erişim Tarihi 10 Mart 2025]. Erişim adresi:https://www.who.int/health-topics/crimean-congo-haemorrhagic-fever/#tab=tab_1
83. Överby AK, Gredmark-Russ S. Tick-borne encephalitis (TBE). *Neurobiol Infect Dis*. 2024;(June):451–472.
84. Dahmani M, Anderson JF, Sultana H, Neelakanta G. Rickettsial pathogen uses arthropod tryptophan pathway metabolites to evade reactive oxygen species in tick cells. *Cell Microbiol*. 2020 Oct;22(10):e13237.
85. Malgwi SA, Ogunsakin RE, Oladepo AD, Adeleke MA, Okpeku M. A forty-year analysis of the literature on Babesia Infection (1982–2022): a systematic bibliometric approach. *Int J Environ Res Public Health*. 2023;20(12):6156.
86. Bonnet SI, Nadal C. Experimental infection of ticks: An essential tool for the analysis of babesia species biology and transmission. *Pathogens*. 2021;10(11):1–14.
87. Bieker, Jill M. Chemical inactivation of viruses. Kansas State University, 2006.
88. McClure EA, Nelson MC, Lin A, Graf J. *Macrobdella decora*: Old World Leech Gut Microbial Community Structure Conserved in a New World Leech. *Appl Environ Microbiol*. 2021 May;87(10):1–20.
89. Cardinale BJ, Duffy JE, Gonzalez A, Hooper DU, Perrings C, Venail P, et al. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nat* 2012 4867401. 2012

Jun;486(7401):59–67.

90. Alaama M, Kucuk O, Bilir B, Merzouk A, Ghawi AM, Yerer MB, et al. Development of Leech extract as a therapeutic agent: A chronological review. *Pharmacol Res - Mod Chinese Med*. 2024 Mar;10:100355.
91. Rajfur K, Rajfur J, Fras-Labanc B. Does the use of hirudotherapy reduce pain? A narrative review. *Med Sci Pulse*. 2024 Jun;18(SUPPLEMENT 3).
92. Ünal K, Erol ME, Ayhan H. Literature Review on the Effectiveness of Medicinal Leech Therapy in the Wound Healing. *Ankara Med J*. 2023;23(1):151–164.
93. Sağlık Bakanlığı TC, Sağlık TC, Sağlık B, Genel H, Geleneksel Ve Tamamlayıcı M, Uygulamaları T, et al. Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları ve İlgili. 2016.
94. Claar DC, Kuris A, Leslie KL, Welicky RL, Williams MA, Wood CL. Parasite Biodiversity Network of Conservation Educators and Practitioners. *Source Lessons Conserv*. 2021;11:39–57.
95. Wagner T, Ulrich D. Increasing multidrug resistance in leech borne infections. Should we adjust antibiotic treatment regime in plastic surgery? A systematic review. *Eur J Plast Surg*. 2024 Dec;47(1):1–12.
96. Kaygorodova IA. Role of Antimicrobial Peptides in Immunity of Parasitic Leeches. *Dokl Biol Sci*. 2023 Aug;511(1):183–195.
97. Avagyan HR, Hakobyan SA, Avetisyan AS, Bayramyan N V., Hakobyan LH, Poghosyan AA, et al. The pattern of stability of African swine fever virus in leeches. *Vet Microbiol*. 2023 Sep;284:109835.
98. Al-Khleif A, Roth M, Menge C, Heuser J, Baljer G, Herbst W. Tenacity of mammalian viruses in the gut of leeches fed with porcine blood. *J Med Microbiol*. 2011;60(6):787–792.
99. Nehili M, Ilk C, Mehlhorn H, Ruhnau K, Dick W, Njayou M. Experiments on the possible role of leeches as vectors of animal and human pathogens: a light and electron microscopy study. *Parasitol Res*. 1994;80(4):277–290.

EKLER

EK-1: Etik kurul izni

	T.C. KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ TIP FAKÜLTESİ Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : E-77504701-204.01.07-00000715179 Konu : Etik Kurul	10.01.2025
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Alican BİLDEN Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi	
İlgi : 10.01.2025 tarihli ve E.715163 sayılı dilekçeniz. "Environmental and Biological Interactions of Hepatitis B Virus in Leeches: A Molecular Investigation" başlıklı çalışmanın Etik Kurul almasına gerek olmadığına 07.01.2025 tarihli Etik Kurul toplantısında görüşülerek oy birliğiyle karar verildi. Bilgilerini ve gereğini arz ederim.	
Doç. Dr. Recai DAĞLI Kurul Başkanı	

ORIGINAL ARTICLE

Annals of Agricultural and Environmental Medicine
www.aaem.pl



Environmental and biological interactions of Hepatitis B virus in leeches – a molecular investigation

Alican Bilden^{1,A,B,D,F}, Merve Kahraman^{1,B,E}, İbrahim Halil Şahin^{2,D-E},
Nadia İbrahim Kamil Kamil^{1,B-D}, Ömer Karakamış^{3,C}, Elif Sevim^{3,C,F}, Muttalip Çiçek^{1,A,E-F}

¹ Medical Parasitology, Ahi Evran University, Kırşehir, Turkey

² Medical Services and Techniques, Eren University, Bitlis, Turkey

³ Medical Biology, Ahi Evran University, Kırşehir, Turkey

A – Research concept and design, B – Collection and/or assembly of data, C – Data analysis and interpretation, D – Writing the article, E – Critical revision of the article, F – Final approval of the article

Bilden A, Kahraman M, Şahin İH, İbrahim Kamil Kamil N, Karakamış Ö, Sevim E, Çiçek M. Environmental and biological interactions of Hepatitis B virus in leeches – a molecular investigation. Ann Agric Environ Med. doi: 10.26444/aaem/205390

Abstract

Objective. The aim of the study is to investigate whether transovarial transmission of the Hepatitis B virus occurs in leeches, and whether the virus is released into the external environment through their secretions.

Materials and Method. 52 reproductive leeches (*Hirudo verbana*) were experimentally fed with hepatitis B infected human blood. From these reproductive leeches, juveniles were produced. Additionally, diverse leech-associated samples were collected, encompassing water and soil from the habitats of the reproductive leeches, faeces, body surface secretions, and cocoon shells. Each sample was analyzed for the presence of the hepatitis B virus using advanced molecular methods, specifically, real-time quantitative polymerase chain reaction.

Results. 90 juveniles, 15 leech-associated samples, and 13 cocoon shells were analyzed. Analyses did not reveal the presence of HBV in any of the 90 juveniles, or in the leech-associated samples. The results suggest that HBV is neither vertically transmitted to the juveniles through transovarial transmission, nor disseminated into the external environment through secretions or other biological materials linked to leeches.

Conclusions. The study concludes that leeches (*Hirudo verbana*) do not facilitate the transovarial transmission of HBV. Moreover, the absence of HBV in the environmental samples highlights the minimal risk of viral spread via leech secretions, or associated materials. These findings provide critical insights for the ecological management of leech populations, especially in minimizing viral transmission risks. In the literature, studies on transovarial transmission in leeches are quite limited, and it has been concluded that while the data from the presented study are valuable, they are insufficient and highlight the need for further research in this field.

Key words

ecological safety, molecular analysis, transovarial transmission, leeches, Hepatitis B virus, *Hirudo verbana*



CERTIFICATE



OF PARTICIPATION

This Certificate is Proudly Presented to

Nadia İbrahim KAMİL

attended the Ahi Evran 5th International Conference on Scientific Research
held on May 16-18, 2025 / Dubai, UAE, organised by
Kırşehir Ahi Evran University and IKSAD Institute
with an oral presentation entitled

ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL INTERACTIONS OF HEPATITIS
B VIRUS IN LEECHES: A MOLECULAR INVESTIGATION

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	NADIA İBRAHİM KAMIL KAMIL
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer:



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
Fakülte	FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ
Bölümü	MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
Mezuniyet Yılı	2023

Yüksek Lisans	
Üniversite	AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
Enstitü Adı	SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
Anabilim Dalı	TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
Programı	TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
Mezuniyet Tarihi	2025