



Synthesis of some new derivatives of tick pheromones and investigation of pheromone properties

Erkan YANARATES^{*1}, Yılmaz YILDIRIR², Ali DİŞLİ²
ORCID: 0000-0003-1378-5284, 0000-0001-9091-5324, 0000-0002-5409-8838

¹ Kastamonu University, Education Faculty, Mathematics and Science Education Department, Kastamonu, Turkey.

² Gazi University, Science Faculty, Chemistry Department, Ankara, Turkey

Abstract

In this study, the families *Ixodidae* (hard ticks) ticks of the species in Turkey pheromones of some derivatives were synthesized and their pheromone properties were investigated. In the first phase of the study, aniline derivatives of the pheromones to be used in the synthesis were obtained. By using hydrochloric acid or sulfuric acid with sodium nitrite, diazonium salts were produced from these aniline derivatives. The novel pheromone derivatives were synthesized by reacting to a series of diazonium salts with pyrrolidine, morpholine and piperidine bases separately. Structures of the synthesized compounds were determined by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR, ¹³C-NMR) and Mass Spectrometry (MS). Whether the synthesized compounds show pheromone feature has experimented on the live ticks under the supervision of an expert.

Key words: Tick, pheromone, the chemical structure of pheromones, triazene

----- * -----

Kene feromonlarının bazı yeni türevlerinin sentezi ve feromon özelliklerinin incelenmesi

Özet

Bu çalışmada, *Ixodidae* familyasına bağlı kenelerin Türkiye'de yaşayan türlerine ait bazı feromonların yeni türevleri sentezlenmiş ve feromon özellikleri incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, sentezde kullanılan feromonların anilin türevleri kullanılmıştır. Bu anilin türevlerinden hidroklorik asit veya sülfürik asit beraberinde sodyum nitrit kullanılarak diazonyum tuzları elde edilmiştir. Bir dizi diazonyum tuzu piroldin, morfolin ve piperidin bazlarıyla ayrı ayrı tepkimeye sokularak yeni feromon türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), Nükleer Manyetik Rezonans (¹H-NMR/¹³C-NMR) ve Kütle Spektrometresi (MS) yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin feromonik özellik gösterip göstermedikleri uzman denetiminde canlı keneler üzerinde incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kene, feromon, feromonların kimyasal yapısı, triazen

1. Giriş

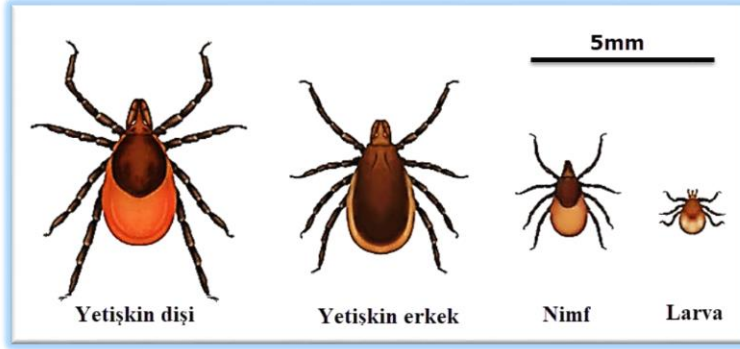
Son yıllarda yaygın olan Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) adında bir hastalık türü büyük bir problem olarak ciddiyetini korumaktadır. KKKA hastalığına sebep olan virüs vücuda kene tutunmasıyla yerleşmektedir. Bu virüsleri bulaştırmada ve taşımada etkin rol oynayan kene ülkemizin bazı bölgelerinde sıkça görülmektedir. Birçok canlının yaptığı gibi keneler de toplanmak veya karşı cinsi etkilemek amacıyla feromon adı verilen bazı kimyasal maddeler salgılamaktadırlar. Kenelerin kontrol edilebilmesi veya zararsız hale getirilebilmesi amaçlanarak yapılan bu çalışmada *Ixodidae* familyasına bağlı olan kenelerin Türkiye'de yaşayan türlerine ait feromonların bazı *piroldin*, *morfolin* ve *piperidin* türevleri sentezlenmiştir. On altı tanesi yeni olan bu bileşiklerin feromon özellikleri, uzman denetiminde canlı keneler kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca doğal feromonların çoğu uçucu olduğundan, sentezlenen bileşiklerin yeni feromon türevleri olarak doğada daha uzun süre kalabilmeleri önemlidir. Bu amaçla, sentezlenen bileşiklerin asidik

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905353015204; Fax.: +9003662801038; E-mail: eyanarates@kastamonu.edu.tr

koşullarda yavaş yavaş bozularak tekrar feromonlara dönüşmesi ve sahada feromon tuzağı olarak kullanılması mümkün olabilir.

Sakırğa veya yavısı gibi isimlerle de bilinen kene insan ve hayvanlardan kan emerek beslenen bir böcektir. Dünyanın birçok bölgesinde yaşayabilen keneler açık arazide, ağaç, otların bol olduğu yerlerde bulunur. Keneler “Haller” adındaki duyu organı sayesinde ısı, hava koşulları, koku ve bazı kimyasalları tespit ederler [1, 2].

Başta yabani ve evcil memeliler olmak üzere birçok canlıya saldıran keneler, kuşlar da dahil birçok hayvana zarar vermektedirler. Bu zarar, kenenin hayvan vücuduna yapıştıktan sonra orada çoğalmasından tüm vücudu sararak hayvanın ölümüne kadar uzanmaktadır. İnsanlara ve hayvanlara bu denli zararı olan kenelerin dünyada birçok türü vardır. Bugün bilinen 907 kene türünün (Ixodidae: 720, Argasidae: 186 ve Nuttalliellidae: 1) ailelerine ait olduğu kabul edilmektedir. Ixodidae keneleri hem tür sayısının fazlalığı hem de hastalık etkenlerini taşımaları bakımından diğer türlerden çok daha önemlidirler. Bu türlerden 33'ünün insanı bir konak olarak tercih ettiği ve 28'inin de doğrudan hastalık etkenlerini bulaştırdığı bilinmektedir [2, 3, 4].



Şekil 1. Kenelerin yaşam evreleri

Ixodidae türleri, genellikle ilkbahar ve sonbahar mevsimleri arasında aktiftirler. Keneler hayatları boyunca her dönemde (larva-nimf-yetişkin) kan emmek zorundadırlar. Keneler kan emme esnasında çiftleşirler. Ortalama 3.000 ile 20.000 arasında yumurta yapabilen dişi keneler yumurtalarını taş, toprak ve merada yaprakların altına, toplu bir şekilde bırakırlar. Yumurta büyüklükleri yaklaşık 0,8 mm'dir. Dişiler yumurtladıktan sonra ölürler (Argasidae türleri ölmez). Keneler türlerine göre konaklardan farklı sürelerde kan emerler ve kan emdikten sonra yine gömlek değiştirerek nimf olurlar. Aç olan nimfler kan emer doyar ve gömlek değiştirdikten sonra aç olgun hale gelir. Bu döngü böyle devam eder [4, 5].

Türkiye iklimi, yüzey şekli ve bitki örtüsü bakımından kenelerin yaşayabilmesi için uygun şartlara sahip bir ülkedir. Kayıtlara göre bu güne kadar Türkiye'de 10 cinse ait 32 kene türüne rastlanmıştır. Ixodes, Hyalomma, Dermacentor, Haemaphysalis ve Rhipicephalus soylarına ait kene türlerine daha sık rastlanılmaktadır [2, 6, 7].

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı

KKKA ilk kez 1944 yılında Batı Kırım'da Sovyet askerleri arasında görülmüş ve hastalığa Kırım Hemorajik Ateşi adı verilmiştir. Daha sonra 1956 yılında Kongo'da (Zaire) ateşli bir hastada tespit edilmiş ve Kongo virüsü denilmiştir. 1969'da ise bu iki virüsün aynı virüs olduğu belirlenmiş ve hastalığa Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi adı verilmiştir.

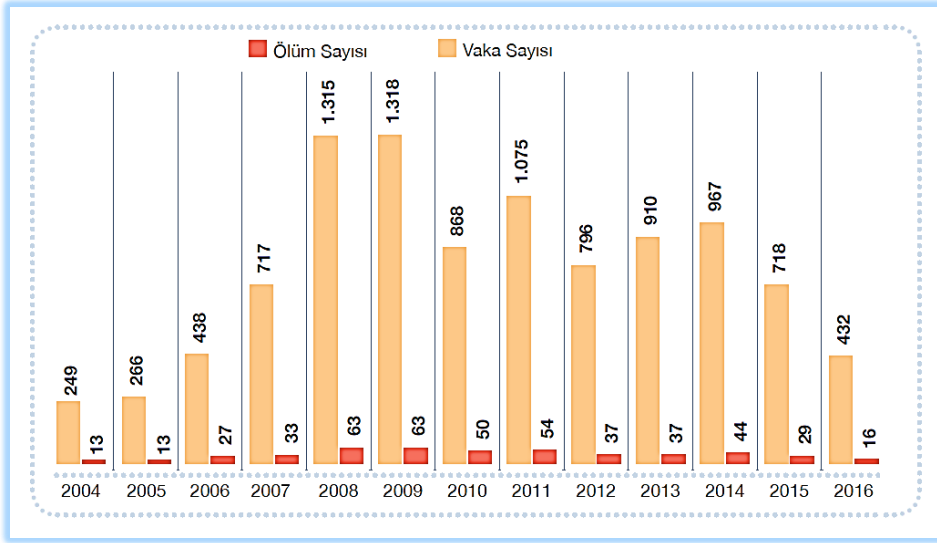
Kenelerin neden olduğu enfeksiyonlar sıklıkla belirli coğrafik bölgelerde ön plana çıkarken, KKKA Afrika, Asya, Orta Doğu ve Doğu Avrupa'da endemik olarak görülmektedir. Son yıllarda Kosova, Arnavutluk, İran, Pakistan ve Güney Afrika'dan sporadik (seyrek) ve epidemik (salgın) vakalar bildirilmiştir [1, 8, 9].

Türkiye'de bu hastalığa ilk defa 2002 yılında rastlanmıştır ve 2003 yılında tanımlanmıştır. Hastalığın görülmeye başladığı ilk yer Tokat yöresi olmasına rağmen, yapılan araştırmalara göre bu konuda halkın hala bilgi düzeyinin yetersiz olduğu görülmektedir. Aynı zamanda kene vakalarının yoğun olduğu yerlerde KKKA hakkında eğitimlerin tüm halka ulaşılarak verilmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır [10]. En çok ilkbahar ve yaz mevsimlerinde rastlanan KKKA hastalığı genellikle İç Anadolu'nun kuzeyi, Karadeniz'in güneyi ve Doğu Anadolu'nun kuzeyinde görülmektedir. Hastalığın en çok görüldüğü iller Erzurum, Erzincan, Gümüşhane, Bayburt, Tokat, Yozgat, Sivas, Amasya, Çorum, Çankırı, Bolu, Kastamonu ve Karabük'tür [11, 12, 13].

KKKA'nın belirtileri: Ani yükselen ve 40 derece civarında gezen ateş, baş dönmesi, burun akıntısı, ishal ve kusma gibi belirtiler görülmektedir. Kırsal bölgelerde yaşayan insanlar hala bu hastalık yüzünden hayatlarını kaybetmeye devam ediyor [15]. Yüksek ateş, baş, karın, kol ve bacaklarda şiddetli ağrılar, yoğun halsizlik, ishal, kusma, yüzde kızarıklık, ileri aşamalarda burun ve vücudun farklı yerlerinde kanamalar, kol, bacak ve bedende morluklar, idrar ve dışkıda kan görülebilmektedir [11, 14].

KKKA'dan korunma yöntemleri: Ahır ve ağıllara, kırsal alanlara ve piknik alanlarına gidenler mümkün olduğunca vücutta açık kısım kalmamasına özen göstermeli kenelerin daha kolay fark edilmesi nedeniyle açık renkli

elbiseleri giymeyi tercih etmelidirler. **KKKA vaka ve ölüm sayıları:** Şubat 2017'de yayınlanan T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Faaliyet Raporu 2016 verilerine göre Türkiye’de son 13 yılda KKKA nedeniyle 479 kişi hayatını kaybetti. Bakanlığın KKKA vaka ve ölüm raporuna göre 2004-2016 yılları arasında 10.069 kene vakası yaşandı. 63’ü ölümlle sonuçlanan en fazla vaka 2009 yılında 1318 olarak tespit edildi. 2016 yılında 432 KKKA vakası ve 16 ölüm görülmüş olup KKKA vaka ve ölüm sayıları 2016 yılında son 10 yılın en düşük seviyelerinde seyretmiştir [15].



Şekil 2. KKKA vaka ve ölüm sayıları (2004-2016) [15]

Feromon: Feromonlar, böcekler, diğer hayvanlar ve insanlar tarafından kimyasal iletişimi sağlamak amacıyla dışarıya salınan ve o türün diğer bireyleri tarafından hissedilerek tepki göstermelerine sebep olan kimyasal maddelerdir. Örneğin cinsel çekici feromon, dişi böceğin erkeğini kilometrelerce uzaktan bulabilmesini sağlayacak kadar etkindir. Bu feromonlar, dişi böcekler tarafından çiftleşmeye hazır olduklarını belli etmek ve erkek bireylerin dişileri izleyerek bulabilmeleri için salgılanırlar.

Böcekler toplanma, alarm ve iz bırakma gibi feromonları da salgılamaktadırlar. Feromonların etkileri çok önceden beri bilinmektedir. Feromon ilk defa 1954 yılında ipek böceklerinin koku salgı bezlerinden elde edilerek tanımlanmış ve erkekleri çektiği belirlenmiştir [6, 16]. Feromonlar, çok uzak mesafelerden bile hava hareketleri ile taşınabilir ve erkek böceklerin antenleri aracılığıyla algılanırlar. Bu antenler molekül seviyesinde bile ayırt edebilecek duyarlıktadırlar [4].

Kene feromonlarının kimyasal yapıları

Kenelere ait feromonların çoğu fenol türevi olan kimyasal maddelerden oluşmaktadır. Bilinen kene feromonlarının türleri ve isimleri aşağıda görülmektedir.

Toplanma feromonları (çekici feromon):

Fenol [17, 18, 19], 2-klorofenol, 2-bromofenol, 2-nitrofenol [17, 18, 20], o-kresol, benzil alkol [20, 21], p-kresol [17, 18, 19], benzoik asit, benzaldehit, salisilik asit, salisilaldehit [18, 20, 21, 22, 23], metil salisilat [17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25].

Çiftleşme feromonları (cinsel çekici feromon):

2,6-dibromofenol ve 2,6-diklorofenol [18, 19, 20, 23, 26].

Bu maddelerin feromon özelliği gösterebilmesi için ayrıca feromon aktifleştirici olarak bilinen ve genellikle uçucu olan bazı organik maddeler de bulunmaktadır [18, 20, 23, 25].

Bilinen bazı feromon aktifleştirici maddeler: Bütirik asit, izobütirik asit, miristik asit, palmitik asit, pelargonik asit, kaprik asit, limonen ve diğer orta zincirli yağ asitleridir. Yukarıdaki kimyasal bileşiklerin feromon özelliği gösterebilmeleri için feromon aktifleştirici maddelerle belirli oranlarda karışmış olmalıdırlar. Bu oran feromonların kimyasal yapılarına göre değişebilmektedir. Ancak feromonun uçuculuğu daha iyi olması için feromon aktifleştirici maddenin derişimi daha yüksek (örneğin 4-8 katı) olmalıdır [22, 24]. Feromon aktifleştirici madde olarak rol oynayan organik yağ asitlerine bazı bitki çekirdeklerinde ve özlerinde de rastlanmaktadır [27].

Bugüne değin akarlarda alarm, eşey, toplanma ve iz işaret feromonu olmak üzere, dört tip feromonun bahsi geçmiştir. Akar feromonları içerisinde, üzerinde en fazla çalışılan feromon alarm feromonu olmuştur. Genellikle bir akardan tek tip feromon elde edilmiştir. Fakat iki farklı feromona sahip olan türler de vardır. Hatta bazı türlerde alarm, eşey ve toplanma olmak üzere üç farklı feromon aktivitesi birden tespit edilmiştir. Bu farklı aktiviteler ya farklı bileşenlere sahip olunarak ya da tek bileşenin değişik şartlar altında farklı etkiler göstermesi ile sağlanmaktadır [28].

Kene feromonlarıyla ilgili yapılan bazı çalışmalar

Birçok kene türünde feromonla birlikte, farklı oranlarda *feromon aktifleştirici madde* bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca kenelerin çok küçük derişimlerdeki (ng/L) feromonlara bile tepki gösterebileceği bilinmektedir [17, 18, 22, 24].

Amblyomma variegatum türüne ait bir feromonun *o-nitrofenol*, *metil salisilat* ve feromon aktifleştirici olarak da küçük zincirli bir yağ asidi olan pelargonik asitten oluşan bir karışım olduğu bulunmuştur [24].

Kenelerde iletişimi veya fizyolojik ve ekolojik etkileşimleri sağlayan bazı fenolik ve aromatik bileşikler de vardır. Bunlar; *fenol*, *2,6-diklorofenol*, *p-kresol*, *salisilaldehit*, *metil salisilat*, *2-nitrofenol*, *benzaldehit*'tir. Birçoğu fenol türevi olan bu feromonların yanında; pürinler ve bazı steroidler ile izobütirik asit, pelargonik asit, miristik asit ve oleik asit gibi bazı yağ asitleri bulunmaktadır [18].

Dişi kenelerden elde edilen özütün *fenol* ve *p-kresol* içerdiği bulunmuştur. Aynı fenoller New York'ta Ixodidae familyasının 5 farklı sert kene (hard tick) türünde de bulunmuştur. Bu beş türün üçünün ayrıca *2,6-diklorofenol* de içerdiği gözlenmiştir [17].

Kenelerde seks feromonu olarak bilinen *2,6-diklorofenol*, farklı türlerde farklı miktarlarda bulunmuştur. Örneğin, Gaz Kromatografisi ile belirlenen, 1000 tane beslenmemiş *H. dromedarii* dişisinin heksan ekstraktında kene başına 35 ng *2,6-diklorofenol* bulunurken, 1100 tane beslenmemiş *Hyalomma anatolicum excavatum* dişisinin heksan ekstraktında kene başına 20 ng *2,6-diklorofenol* bulunmuştur. Beslenmiş 56 tane *Hyalomma dromedarii* erkek örneklerinde ise *2,6-diklorofenol* olduğuna dair hiçbir kanıt bulunamamıştır. Böylece *Hyalomma* türlerinin çiftleşme davranışları ile ilgili yapılan bu çalışmada dişi kenelerin uçucu bir feromon yaydıkları belirtilmiştir [19].

Ciddi hastalıklara ve hatta ölüme sebep olabileceği vurgulanan bir başka çalışmada aktarıldığına göre; keneler biyolojik vektör olarak rol alırlar ve kan emme sırasında tükürük bezlerindeki sporozoitleri konaklarına aktarırlar. Böylece kana geçen sporozoitler eritrositlere yerleşmekte ve konaktaki tüm süreç bu hücrelerde geçmektedir. Hastalığın klinik bulguları da yine söz konusu eritrositlerin yıkımı ile ilişkilidir. Muhtemel bulgular arasında ateş, sarılık, anemi ve ölüm vardır. Bazı kene türlerine ait etkenin sebep olduğu hastalığın ateş ve sarılık ile izlediği bildirilmiştir. Öte yandan yaşlı sığırlarda patojen olduğu ve akut olgularda birkaç gün içinde ölümün gündeme gelebileceği belirtilmiştir [29, 30].

Birincil arilaminlerin diazonyum tepkimeleri

Aminlerin nitroz asitle verdiği en önemli tepkime birincil aril aminlerle olanıdır. Bunun nedeni, elde edilen arendiazonyum tuzundan geniş yelpazeli (fenoller, aril halojenürler, aril siyanürler ve benzen türevleri) ürünlerin elde edilmesidir. Arendiazonyum tuzları çok kararlı olmamakla birlikte alifatik diazonyum tuzlarına göre çok daha kararlıdır. Tepkime karışımının 5°C'nin altında tutulduğunda çözelti içerisinde belirli bir süre karalı kalabilirler. Birincil aminlerin diazolama tepkimeleri oldukça önemlidir. Çünkü diazonyum grubu ($N\equiv N$) diğer fonksiyonel gruplarla yer değiştirebilirler [31, 32].

2. Materyal ve yöntem

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar Merck, Sigma-Aldrich, Acros ve Fluka firmalarından temin edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler sentezler için yeterli saflıkta oldukları için ileri bir saflaştırma işlemi uygulanmamıştır.

2.1. Materyal

¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları;

Bruker 300 MHz NMR Spektrometresi (Gazi Ü. Fen Fakültesi)

Bruker 400 MHz NMR Spektrometresi (Hacettepe Ü. Fen Fakültesi)

IR spektrumları; Thermo Nicolet 6700 ATR cihazı ve Mattson-1000 FT IR cihazı

(First v1.60, 1992, Mattson Instruments Inc.) (Gazi Ü. Fen Fakültesi)

Kütle spektrumları; Waters LCT Premier XE LTOF (TOF MS) cihazı (Gazi Ü. Eczacılık Fakültesi).

Sentezlenen bileşiklerin erime ve kaynama noktaları için;

Elektrotermal 9100 Erime Noktası Cihazı (Gazi Ü. Fen Fakültesi)

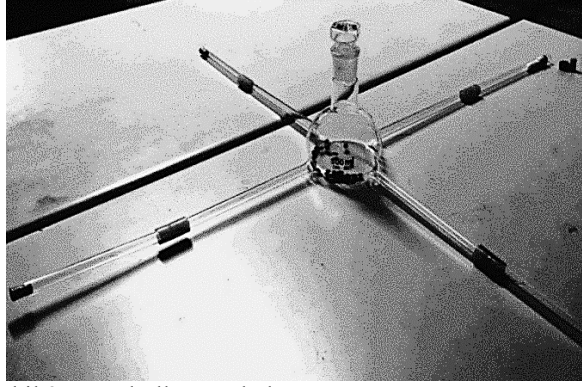
Melting Point Büchi M-560 Erime/Kaynama Noktası Cihazı (Kastamonu Ü. Eğitim Fakültesi)

Vakum pompası

Feromonik inceleme çalışmaları için Kastamonu ve çevresinden toplanan toplam 83 adet kene

Özel olarak yaptırılmış dört kollu cam balon;

Cam balonun (250mL) tabanına (1x30)cm boyutlarında 4 adet cam boru kaynatılarak hazırlanmıştır.



Şekil 3. Dört kollu cam balon

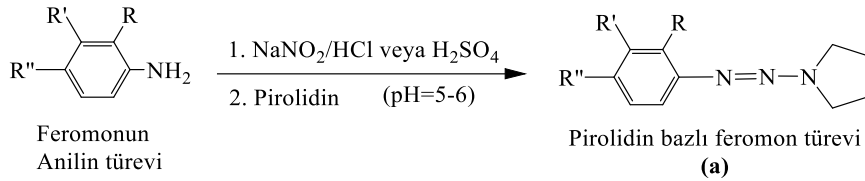
2.2. Yöntem

Bu çalışma üç aşamadan meydana gelmiştir. Bunlar;

- *Ixodidae* familyasına bağlı olan kenelerin Türkiye'de yaşayan türlerine ait feromonların kimyasal yapıları, literatür çalışmasıyla belirlenmiştir.
- On altısı yeni olan 28 tane feromon türevi sentezlenmiş ve bileşiklerin yapıları aydınlatılmıştır.
- Sentezlenen bileşiklerin canlı keneler üzerinde feromonik özellikleri incelenmiştir.

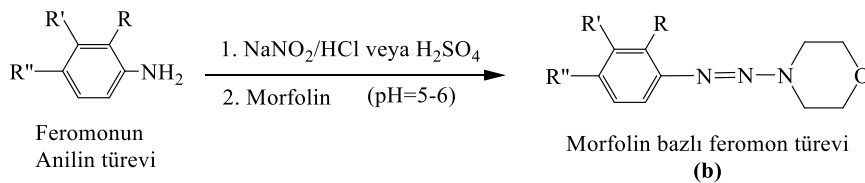
Feromonların kimyasal yapılarını belirleme çalışmaları önceki bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir. Bu feromonların anilin türevleri kullanılarak, sentezlenen bileşiklerin çözünürlüğüne göre HCl veya H₂SO₄ ile süstitüeanilinyum tuz çözeltileri hazırlanmıştır. Elde edilen anilinyum tuzları NaNO₂'in sulu çözeltisi ile süstitüebenzendiazonyum tuzlarına dönüştürülmüştür. Diazonyum tuz çözeltileri, uygun pH aralıklarında (genellikle 5-6) ve belli oranlarda *pirolidin*, *morfolin* ve *piperidin* çözeltileri ile karıştırılarak triazen (-N=N-N<) şeklinde kenetlenmeleri sağlanmış ve *feromon türevi* oldukları düşünülen yeni bileşikler elde edilmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin tepkime mekanizmaları aşağıda verilmiştir.

Pirolidin bazlı feromon türevlerinin sentezi



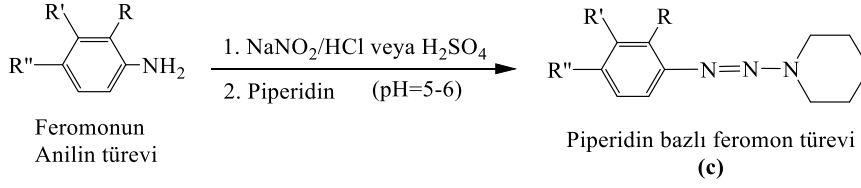
- a1) R=COOH, R', R''=H a7) R=H, R'=OH, R''=COOCH₃ (yeni)
a2) R, R''=H, R'=COOH (yeni) a8) R=H, R'=NO₂, R''=OH (yeni)
a3) R, R'=H, R''=COOH a9) R=H, R'=Cl, R''=OH (yeni)
a4) R=CH₂-OH, R', R''=H a10) R=OH, R', R''=H (yeni)
a5) R, R''=H, R'=CH₂-OH a11) R, R''=H, R'=OH (yeni)
a6) R, R'=H, R''=CH₂-OH (yeni) a12) R, R'=H, R''=OH (yeni)

Morfolin bazlı feromon türevlerinin sentezi



- b1) R=COOH, R', R''=H b4) R=CH₂-OH, R', R''=H (yeni)
b2) R, R''=H, R'=COOH b5) R, R''=H, R'=CH₂-OH (yeni)
b3) R, R'=H, R''=COOH b6) R, R'=H, R''=CH₂-OH (yeni)
b7) R=H, R'=OH, R''=COOCH₃ (yeni)

Piperidin bazlı feromon türevlerinin sentezi



- c1) R=COOH, R', R''=H c4) R=CH₂-OH, R', R''=H (yeni)
 c2) R, R''=H, R'=COOH c5) R, R''=H, R'=CH₂-OH (yeni)
 c3) R, R'=H, R''=COOH c6) R, R'=H, R''=CH₂-OH (yeni)
 c7) R=H, R'=OH, R''=COOCH₃ (yeni)

3. Bulgular

Feromonların anilin türevleri kullanılarak bir dizi süstitüe triazen bileşiği sentezlendi (a1-a12, b1-b7, c1-c7). Sentez basamakları ve bunlara ait karakterizasyon sonuçları aşağıda verilmiştir.

2-(Pirolidin-1-ildiazenil)benzoik asit sentezi (a1):

0,69 g (5 mmol) 2-Aminobenzoik asit üzerine 5 mL su ve 2 mL %37'lik HCl ile hazırlanmış asit çözeltisi ilave edildi ve oda sıcaklığında karıştırılarak çözüldü.

Çözelti manyetik karıştırıcı üzerinde tuz-buz banyosuna yerleştirilerek karıştırılmaya devam edildi.

Tepkime boyunca sıcaklığın 0-5°C arasında olmasına dikkat edildi. Buz banyosu üzerindeki çözelti üzerine 10 mL suda çözülmüş 0,42 g (6 mmol) NaNO₂ çözeltisi damla damla ilave edildi.

İlave işlemi tamamlandıktan sonra çözelti 30 dakika daha karıştırıldı. Bu karışım önceden hazırlanmış ve soğutulmuş olan 10 mL suda çözülmüş 3,3 mL (8 x 5 mmol) *pirolidin* çözeltisi üzerine yavaş yavaş ilave edildi. Yine tepkime sıcaklığının 0-5°C arasında kalması sağlandı.

Ürün oluşumu pH'ya bağlı olduğu için karışım üzerine *pH=5-6* civarına gelene kadar damla damla 3M HCl çözeltisi ilave edildi. Bu şekilde 20 dakika daha karıştırıldıktan sonra oluşan katı ürün süzülerek ayrıldı.

Elde edilen ürün vakum etüvünde kurutulduktan sonra Flash kromatografisi yöntemiyle silikajel dolgulı kolonda kloroform-metanol (3:1) çözücü çifti kullanılarak ayrıldı.

Döner buharlaştırıcı ile çözücüler uzaklaştırılarak ürün saflaştırıldı. Verim: %80, e.n: 121-123°C;

IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3520-2160 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970 (C-H), 1667 (C=O), 1594, 1573, 1466 (C=C);

¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 13.80-14.30 (yayvan, 1H), 7.98 (i, 1H), 7.65 (i, 1H), 7.57 (ü, 1H), 7.27 (ü, 1H), 3.55-4.10 (ç, 4H), 2.06 (ç, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 167, 149, 134, 132, 126, 122, 116, 53-48, 24; MS C₁₁H₁₃N₃O₂ (M⁺) (m/z): 220.11.

Diğer ürünler de benzer şekilde sentezlendi. Ancak, a1-a12 ürünlerinin sentezindeki pirolidin yerine, b1-b7 ürünlerinin sentezinde morfolin ve c1-c7 ürünlerinin sentezinde ise piperidin kullanıldı.

3-(Pirolidin-1-ildiazenil)benzoik asit (a2): Verim: 83%; e.n. 107-110°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3355-2160 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970 (C-H), 1670 (C=O), 1604, 1577, 1452 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 7.87 (i, 1H), 7.67 (i-i, 1H), 7.51 (i-i, 1H), 7.42 (ü, 1H), 3.50-4.00 (i, 2H), 1.98 (b, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 152, 133, 130, 126, 125, 121, 51-46, 24; MS, C₁₁H₁₃N₃O₂ (M⁺) (m/z): 220.11.

3-(Pirolidin-1-ildiazenil)benzoik asit (a3): Verim: 91%; e.n. 185-186°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3456 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970 (C-H), 1667 (C=O), 1598, 1575, 1450 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 12.7 (b, 1H), 7.37 (i, 4H), 7.89 (i, 2H), 3.80-4.00 (ç, 2H), 3.50-3.70 (ç, 2H), 1.90-2.06 (ç, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 155, 131, 127, 120, 52-47, 24; MS, C₁₁H₁₃N₃O₂ (M⁺) (m/z): 220.10.

2-(Pirolidin-1-ildiazenil)fenilmetanol (a4): Verim: 70%; e.n. 66-67°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3348 (-OH), 3069 (C=C-H), 2977, 2855 (C-H), 1580, 1480, 1444 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.49 (i, 1H), 7.19-7.27 (ç, 2H), 7.06-7.11 (ç, 1H), 4.80 (b, 2H), 4.10-4.50 (yayvan, 1H), 3.50-4.10 (i, 4H), 1.90-2.20 (b, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 149, 134, 132, 128, 125, 116, 65, 51-47, 24; MS, C₁₁H₁₅N₃O (M⁺) (m/z): 206.13.

3-(Pirolidin-1-ildiazenil)fenilmetanol (a5): Verim: oily; k.n. 148-150°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3336 (-OH), 3030 (C=C-H), 2970, 2870 (C-H), 1589, 1483, 1446 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.40 (i, 2H), 7.31 (i, 2H), 7.08 (i, 1H), 4.50-4.80 (ç, 2H), 3.60-4.00 (ç, 4H), 2.14 (yayvan, 1H), 2.02 (ç, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 151, 142, 129, 124, 119, 119, 65, 51-47, 24; MS, C₁₁H₁₅N₃O (M⁺) (m/z): 206.13.

4-(Pirolidin-1-ildiazenil)fenilmetanol (a6): Verim: 66%; e.n. 53-54°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3353 (-OH), 3026 (C=C-H), 2963, 2880 (C-H), 1604, 1500, 1442 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.37 (b, 1H), 7.24-7.33 (ç, 2H), 7.08 (i, 1H), 4.50-4.70 (b, 2H), 3.50-3.90 (ç, 4H), 2.60-3.00 (yayvan, 1H), 1.97 (ç, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 138, 128, 120, 65, 50-45, 24; MS, C₁₁H₁₅N₃O (M⁺) (m/z): 206.13.

Metil 2-hidroksi-4-(pirolidin-1-ildiazetil)benzoat (a7): Verim: 81%; e.n. 134-135°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3456 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2855 (C-H), 1667 (C=O), 1609, 1566, 1455 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 10.88 (b, 1H), 7.78 (i, 1H), 7.00-6.94 (ζ , 2H), 4.10-3.40 (ζ , 7H), 2.20-1.90 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 170, 162, 158, 31, 112, 109, 108, 52, 47, 24; MS, C₁₂H₁₅N₃O₃ (M⁺) (m/z): 250.12.

2-Nitro-4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a8): Verim: 64%; e.n. 97-98°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3456 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970 (C-H), 1581, 1524, 1477 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 7.73 (b, 1H), 7.52 (i, 1H), 7.06 (i, 1H), 3.65-3.85 (ζ , 4H), 1.90-2.10 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 151, 143, 129, 128, 120, 115, 45-46, 24; MS, C₁₀H₁₂N₄O₃ (M⁺) (m/z): 237.10.

2-Kloro-4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a9): Verim: 72%; e.n. 81-82°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3460 (-OH), 3016 (C=C-H), 2972 (C-H), 1604, 1503, 1455 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 9.70-10.20 (yayvan, 1H), 7.26 (i, 1H), 7.12 (i-i, 1H), 6.91 (i, 1H), 3.50-4.00 (yayvan, 4H), 1.94 (ü, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 151, 145, 127, 121, 120, 117, 53-43, 24; MS, C₁₀H₁₂ClN₃O (M⁺) (m/z): 226.07.

2-(Pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a10): Verim: 68%; e.n. 49-50°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3443 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970 (C-H), 1588, 1480, 1455 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 8.00-9.00 (yayvan, 1H), 7.39 (i-i, 1H), 7.04 (ζ , 1H), 6.88 (ζ , 2H), 3.60-4.10 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 136, 126, 121, 120, 116, 49-46, 24; MS, C₁₀H₁₃N₃O (M⁺) (m/z): 192.04.

3-(Pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a11): Verim: 61%; e.n. 99-101°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3650-2430 (-OH), 3062 (C=C-H), 2924 (C-H), 1604, 1504, 1462 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.18 (ü, 1H), 7.01 (i, 1H), 6.94 (ü, 1H), 6.63 (ζ , 1H), 3.50-4.10 (ζ , 4H), 4.30-5.50 (yayvan, 1H), 2.02 (ü, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 158, 151, 129, 112, 111, 106, 52.8-53.6, 24; MS, C₁₀H₁₃N₃O (M⁺) (m/z): 192.11.

4-(Pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a12): Verim: 71%; e.n. 106°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3650-2290 (-OH), 3020 (C=C-H), 2977 (C-H), 1605, 1503, 1450 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 9.10-9.40 (yayvan, 1H), 7.16 (ζ , 2H), 6.70 (ζ , 2H), 3.70-3.90 (ζ , 4H), 1.93 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 154, 141, 122, 115, 54-52, 24; MS, C₁₀H₁₃N₃O (M⁺) (m/z): 192.11.

2-(Morfolinodiazetil)benzoik asit (b1): Verim: 62%; e.n. 132-134°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3650-3340 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970 (C-H), 1680 (C=O), 1596, 1576, 1467 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 12.00-13.00 (yayvan, 1H), 7.75 (i, 1H), 7.46-7.56 (ζ , 2H), 7.57 (ü, 1H), 7.27-7.32 (ζ , 1H), 3.80 (b, 4H), 3.72 (ü, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 169, 149, 133, 130, 126, 126, 118, 65, 48-44; MS, C₁₁H₁₃N₃O₃ (M⁺) (m/z): 236.10.

3-(Morfolinodiazetil)benzoik asit (b2): Verim: 57%; e.n. 93-95°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3650-3150 (-OH), 3015 (C=C-H), 2970 (C-H), 1681 (C=O), 1598, 1587, 1456 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 7.93 (b, 1H), 7.77 (i-i, 1H), 7.60 (i-i, 1H), 7.49 (ü, 1H), 3.70-4.00 (ζ , 8H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 150, 133, 130, 127, 125, 121, 66, 64; MS, C₁₁H₁₃N₃O₃ (M⁺) (m/z): 236.10.

4-(Morfolinodiazetil)benzoik asit (b3): Verim: 72%; e.n. 180-182°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3490-3330 (-OH), 3030 (C=C-H), 2966 (C-H), 1698 (C=O), 1603, 1577, 1457 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 12.50-13.50 (yayvan, 1H), 7.94 (i, 2H), 7.45 (i, 2H), 3.70-4.00 (ζ , 8H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 154, 131, 128, 121, 66, 63; MS, C₁₁H₁₃N₃O₃ (M⁺) (m/z): 236.10.

2-(Morfolinodiazetil)fenilmetanol (b4): Verim: 68%; e.n. 100-101°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3457 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2855 (C-H), 1509, 1479, 1465 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.52 (i, 1H), 7.17-7.23 (ζ , 2H), 7.30-7.33 (ζ , 1H), 4.70-5.00 (ζ , 2H), 3.90 (ζ , 4H), 3.81 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 148, 135, 129, 128, 127, 117, 66, 64, 48; MS, C₁₁H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 222.12.

3-(Morfolinodiazetil)fenilmetanol (b5): Verim: oily; k.n. 92-95°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3630-3080 (-OH), 3026 (C=C-H), 2969, 2859 (C-H), 1600, 1484, 1446 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.42 (b, 1H), 7.26-7.35 (ζ , 2H), 7.15 (i, 1H), 4.50-4.80 (ζ , 2H), 3.77-3.80 (ζ , 4H), 3.70-3.73 (b, 4H), 2.40-3.10 (yayvan, 1H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 142, 129, 125, 120, 119, 66, 65, 48; MS, C₁₁H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 222.12.

4-(Morfolinodiazetil)fenilmetanol (b6): Verim: 70%; e.n. 95-97°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3427 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970, 2857 (C-H), 1606, 1504, 1456 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.44 (i, 2H), 7.36 (i, 2H), 4.60-4.80 (ζ , 2H), 3.86 (ζ , 4H), 3.79 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 139, 128, 120, 66, 65, 48; MS, C₁₁H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 222.13.

Metil 2-hidroksi-4-(morfolinodiazetil)benzoat (b7): Verim: 68%; e.n. 90-100°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3100 (-OH), 3012 (C=C-H), 2967, 2855 (C-H), 1665 (C=O), 1612, 1573, 1455 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 10.60-11.20 (yayvan, 1H), 7.80 (i, 1H), 7.03-6.96 (ζ , 2H), 4.04-3.86 (ζ , 7H), 1.50-2.10 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 169, 152, 133, 130, 128, 126, 122, 71, 52, 48; MS, C₁₂H₁₅N₃O₄ (M⁺) (m/z): 265.11.

2-(Piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c1): Verim: 68%; e.n. 173-174°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3457 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2855 (C-H), 1678 (C=O), 1587, 1485, 1450 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 12.90-13.10 (yayvan, 1H), 7.90 (ü, 1H), 7.72 (ζ , 1H), 7.57 (ζ , 1H), 7.43-7.49 (ζ , 1H), 3.70-3.90 (b, 4H), 1.50-1.80 (b, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 151, 132, 130, 127, 125, 121, 44, 25, 24; MS, C₁₂H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 234.12.

3-(Piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c2): Verim: 73%; e.n. 83-84°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3458 (-OH), 3015 (C=C-H), 2970, 2855 (C-H), 1683 (C=O), 1593, 1496, 1467 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 13.20-13.50 (yayvan,

1H), 7.83 (ç, 1H), 7.54 (ç, 1H), 7.27 (ç, 1H), 3.70-4.00 (ç, 4H), 1.50-2.00 (ç, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 149, 133, 131, 126, 124, 117, 53-44, 24; MS, C₁₂H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 234.12.

4-(Piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c3): Verim: 83%; e.n. 170-172°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3480-3130 (-OH), 3016 (C=C-H), 2968, 2858 (C-H), 1683 (C=O), 1594, 1550, 1440 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 7.85 (i, 2H), 7.30 (i, 2H), 3.70-4.00 (ç, 4H), 1.50-1.90 (ç, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 170, 152, 135, 130, 120, 44, 25, 24; MS, C₁₂H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 234.12.

2-(Piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c4): Verim: 73%; e.n. 81-83°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3456 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2852 (C-H), 1582, 1480, 1436 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.50 (ç, 1H), 7.24-7.29 (ç, 2H), 7.12 (ç, 1H), 4.70-4.90 (ç, 2H), 3.60-3.90 (ç, 4H), 1.73 (ç, 4H), 1.58 (ç, 2H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 149, 134, 128, 127, 126, 117, 64, 47, 25, 24; MS, C₁₂H₁₇N₃O (M⁺) (m/z): 220.15.

3-(Piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c5): Verim: Oily; k.n. 150-152°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3630-3115 (-OH), 3026 (C=C-H), 2970, 2854 (C-H), 1598, 1483, 1438 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.43 (ç, 1H), 7.34 (ç, 1H), 7.29 (ç, 1H), 7.14 (ç, 1H), 4.60-4.80 (ç, 2H), 3.76 (ç, 4H), 1.90-2.20 (yayvan, 1H), 1.60-1.90 (b, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 151, 142, 129, 124, 120, 119, 65, 48, 25, 24; MS, C₁₂H₁₇N₃O (M⁺) (m/z): 220.15

2-(Piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c6): Verim: 64%; e.n. 71-73°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3459 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2856 (C-H), 1600, 1502, 1439 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.42 (i, 2H), 7.33 (i, 2H), 4.50-4.70 (ç, 2H), 3.77 (ç, 4H), 1.50-1.90 (ç, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 138, 128, 121, 65, 48, 25, 24; MS, C₁₂H₁₇N₃O (M⁺) (m/z): 220.14.

Metil 2-hidroksi-4-(piperidin-1-ildiazetil)benzoat (c7): Verim: 74%; e.n. 90-100°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3457 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2854 (C-H), 1665 (C=O), 1611, 1572, 1454 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 10.60-11.00 (yayvan, 1H), 7.78 (i, 1H), 7.01-6.98 (ç, 2H), 4.10-3.89 (ç, 7H), 2.00-1.50 (ç, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 170, 162, 158, 131, 112, 109, 108, 52, 47, 24; MS, C₁₃H₁₇N₃O₃ (M⁺) (m/z): 263.13.

3.1. Sentezlenen bileşiklerin feromonik özelliklerinin incelenmesi

Feromonik özelliklerin incelenmesi üç aşamadan oluşmaktadır;

- Farklı bölgelerden değişik türlerde keneler toplandı,
- Sentezlenen bütün bileşiklere ait numuneler hazırlandı,
- Dört kollu cam balon ve vakum pompasından oluşan deney düzeneği kurularak kenelerin sentezlenen bileşiklere karşı davranışları gözlemlendi.

3.2. Kenelerin toplanması

Kastamonu, kene vakalarının yoğun olarak yaşandığı yerlerden biridir. Bu sebeple Kastamonu'nun bazı bölgelerinde belirli aralıklarla arazi çalışması yapıldı ve **bu çalışma kapsamında kullanılmak üzere toplam 83 adet kene toplandı.** Bunlar;

Ilgaz dağı eteklerindeki Kuzyaka köyünden 12 adet **Ixodes ricinus** türü sığır kenesi, İhsangazi ilçesindeki bazı köylerden 13 adet, Araç ilçesindeki bazı köylerden 24 adet ve Ilgaz yöresindeki Kadıdağı mevkiinden 16 adet **Hyalomma marginatum** türü koyun kenesi ve Kastamonu'nun Devrekâni ilçesine bağlı Kınık köyünden 18 adet **Dermacentor marginatus** türü koyun kenesidir.

Keneler konak üzerinden kene kartı veya ince pens yardımıyla çıkarıldı. Bu işlem yapılırken kenenin zarar görmemesi için dikkat edildi. **Toplanan keneler kapağına küçük delikler açılmış cam şişelere alındı** ve şişelerin üzerine numunenin alındığı tarih, yer ve konağa ait bilgilerin bulunduğu etiketler yapıştırıldı.

Tablo 1. Çalışma bölgeleri ve toplanan kenelere ait tür, adet ve konak bilgileri

Bölge (Yerleşim yeri)	Kene türü	Adet	Kaynak (konak)
Ilgaz Dağı	<i>Ixodes ricinus</i>	12	Sığır
Araç	<i>Hyalomma marginatum</i>	24	Koyun
İhsangazi	<i>Hyalomma marginatum</i>	13	Koyun
Kadı dağı	<i>Hyalomma marginatum</i>	16	Koyun
Devrekâni	<i>Dermacentor marginatus</i>	18	Koyun

Tabloda belirtilen tarihlerde beş farklı bölgeden toplanarak Kastamonu Üniversitesi Eğitim Fakültesi araştırma laboratuvarına getirilen bu kenelerin *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus* ve *Ixodes ricinus* türlerine ait oldukları kene uzmanı tarafından tespit edildi. Bu türlerden ilk ikisi (özellikle de *Hyalomma marginatum*), Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığına sebep olmaktadır.

Sentezlenen bileşiklerin feromonik özellikleri bu kene türleri üzerinde incelendi ve bileşiklerin bu türlere karşı feromon özelliği gösterip göstermedikleri belirlenmeye çalışıldı.

Kenelerde feromonla birlikte, feromona oranla daha fazla miktarda (~ 1:10) *feromon aktifleştirici madde* bulunduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da sentezlenen feromon türevlerinin yanında feromon aktifleştirici olarak 1:10 oranda pelargonik asit (nonanoik asit) kullanıldı.

3.3. Numunelerin hazırlanması

Sırasıyla 1×10^{-1} M'dan 1×10^{-10} M'a kadar (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} molar) şeklinde on farklı derişimde feromon çözeltileri hazırlandı. Bunun için 1 mmol feromon türevi ve 10 mmol nonanoik asit alındı ve 10 mL metanolde çözümlenerek 1×10^{-1} M çözeltiler hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltilerden 1'er mL alınarak 1×10^{-10} M olana kadar 10 farklı derişimde çözeltiler hazırlandı. Böylece, sentezlenen her bir bileşik için on farklı derişimde numuneler hazırlandı.

3.4. Feromonik inceleme çalışmaları

Çözeltilerinin her birinden sırasıyla bir parça pamuğa 0,2 mL numune damlatılarak çözücüsü uzaklaştırıldı (Tablo 2). Dört kollu cam balonun kollarından birinin ucuna numune damlatılmış pamuk, diğer uçlara ise temiz pamuk yerleştirildi. Toplanan keneler dört kollu cam balon içerisine bırakılarak numunelere karşı gösterdikleri davranışlar gözlemlendi. Farklı türlerdeki keneler için ayrı ayrı denemeler yapıldı. Gözlem sırasında vakum pompası yardımıyla çok düşük miktarda vakum uygulandı.

Tablo 2. Kenelerin sentezlenen feromon türevlerine karşı tepkilerinin incelenmesi

Bileşik Adı	Kene Türü	Kene Tepkisi
2-(pirolidin-1-ildiazetil)benzoik asit (a1)	Dermacentor marginatus	-
	Hyalomma marginatum	+
3-(pirolidin-1-ildiazetil)benzoik asit (a2)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
4-(pirolidin-1-ildiazetil)benzoik asit (a3)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
2-(pirolidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (a4)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
3-(pirolidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (a5)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (a6)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
Metil 2-hidroksi-4-(pirolidin-1-ildiazetil) benzoat (a7)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
2-kloro-4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a8)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
2-nitro-4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a9)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
2-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a10)	D.marginatus / H.marginatum	- / -
3-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a11)	D.marginatus / H.marginatum	- / -
4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a12)	D.marginatus / H.marginatum	- / -
2-(morfolinodiazetil)benzoik asit (b1)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
3-(morfolinodiazetil)benzoik asit (b2)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
4-(morfolinodiazetil)benzoik asit (b3)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
2-(morfolinodiazetil)fenil)metanol (b4)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
3-(morfolinodiazetil)fenil)metanol (b5)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
4-(morfolinodiazetil)fenil)metanol (b6)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
Metil 2-hidroksi-4-(morfolinodiazetil) benzoat (b7)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
2-(piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c1)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
4-(piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c2)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
3-(piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c3)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
2-(piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c4)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
3- piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c5)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
4-(piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c6)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
Metil 2-hidroksi-4-(piperidin-1-ildiazetil) benzoat (c7)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +

Tablodaki gözlem sonuçlarında kullanılan "Kene Tepkisi" ölçütlerinden; "+" kenelerin dört kollu cam balonun, numune bulunan ucuna gitmeleri veya burada bir müddet kalmaları (tepki verdikleri) şeklinde değerlendirilmiştir. "-" ise kenelerin numuneye hiç gitmemeleri (hiç tepki vermedikleri) şeklinde değerlendirilmiştir.

Her bir deney yaklaşık olarak 15-20 dakika sürdü. Kenelerin, kullanılan maddelere ait kokularının etkilerinden kurtulmaları için her denemeden sonra yaklaşık 1 saat ara verildi. Bu aralarda dört kollu cam balon asetonla temizlenerek kurutuldu ve bir sonraki deney için laboratuvar havalandırıldı.

Sentezlenen bileşiklerden 10 farklı derişimde hazırlanan çözeltilerin her biriyle keneler üzerinde denemeler yapıldı. İlk 9 deneyde kenelerin tepkilerinin giderek azaldığı hatta 10^{-8} M ve 10^{-9} M derişimlerdeki numunelerde yok denecek kadar azaldığı gözlemlendi. Son deneyde hazırlanan 1×10^{-10} M'lık feromon çözeltilisine karşı ise kenelerin tepkisi hemen hemen hiç gözlenmedi.

Özetle; yapılan gözlemlerde, 1×10^{-1} M'dan 1×10^{-9} M'a kadar olan derişimlerdeki feromon çözeltilerine karşı kenelerin tepkileri giderek azalsa da ilgi gösterdikleri gözlemlendi. Ancak daha düşük derişimlerde hazırlanan feromon çözeltilerinden oluşan numunelere karşı kenelerin tepki vermedikleri gözlemlendi.

Ilgaz Dağlarının eteklerinden toplanan *Ixodes ricinus* türü keneler hiçbir numuneye karşı ilgi göstermediler. Oleik asit ve izobütirik asit gibi farklı feromon aktifleştirici maddeler kullanılmasına rağmen sonuç değişmedi.

Ixodes ricinus türü kenelerin, sentezlenen feromon türevlerine karşı hiç ilgi göstermemeleri, konak, tür ve bölgesel farklılıklara bağlı olabilir. Çalışmanın önemi açısından zaten bu türle ilgili davranışlar fazla önemsenmemiştir. Çünkü *Ixodes ricinus* türü kenelerde Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığına sebep olan virüsün varlığı kanıtlanamamıştır [4, 5].

Diğer iki türe ait kenelerin (*Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus*), sentezlenen feromon türevlerine karşı gösterdikleri tepkiler aşağıdaki tabloda toplu olarak verilmiştir.

4. Sonuçlar ve tartışma

Ülkemizde son yıllarda yaygın olarak görülen KKKA hastalığına neden olan virüsü bulaştıran *Ixodidae* familyasına bağlı olan kene türlerinin feromonlarının kimyasal yapıları araştırılmış ve bu feromonların bazı türevleri sentezlenmiştir.

Sentezlenen bu yeni bileşiklerin feromonik özellikleri farklı türlerde keneler kullanılarak incelenmiştir. Yapılan feromonik inceleme çalışmalarında, sentezlenen bileşiklere karşı hem erkek hem de dişi kenelerin tepki verdikleri gözlenmiştir.

Ancak, yapılan deneylerde 1×10^{-10} M veya daha düşük derişimlerdeki feromon çözeltilerine karşı kenelerin hiçbir tepki göstermediği gözlenmiştir. Buradan, söz konusu deneylerde kullanılan feromon derişimlerinin, kenelerin tepki vermesi için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Feromon çalışmaları Kastamonu'ya bağlı Devrekâni, İhsangazi ve Araç ilçeleri ile Ilgaz Dağı etekleri ve Kadıdağı mevkiinde olmak üzere beş farklı yerleşim bölgesinden alınan üç farklı kene türü üzerinde yapılmıştır. Bu türler *Hyalomma marginatum marginatum*, *Dermacentor marginatus* ve *Ixodes ricinus*'tur.

Bunların ilk ikisi birçok hastalığı taşıyan kene türleridir. Özellikle *Hyalomma marginatum*; KKKA hastalığını bulaştırmada, insanlara tutunmada ve belirgin bir popülasyon artışında öne çıkmaktadır. Bu yönleriyle de en tehlikeli kene türü olarak bilinmekte ve hatta avcı kene şeklinde sınıflandırılmaktadır [3, 4].

Hyalomma marginatum türü bu çalışmada da belirgin bir şekilde öne çıkmıştır; Özellikle yapısında benzoik asit ve benzil alkol bulunan feromon türevlerine karşı diğer türler tepkisiz kalırken, bu *Hyalomma marginatum* türü bütün bu feromon türevlerine ilgi göstermiştir.

Ancak *Ixodes ricinus* ile yapılan deneylerde farklı aktifleştirici maddeler kullanılmasına rağmen kenelerin hiçbir feromona karşı ilgi göstermemiştir. Bu tür keneleri çalışmamızdaki diğer kenelerden ayıran bölge, tür ve konak (sığır) gibi parametreler bulunmaktadır. Kenelerin feromona karşı ilgi göstermemeleri bahsedilen parametrelere bağlı olabilir. Zaten bu tür kenelerin insana tutunmaması ve KKKA hastalığına sebep olan virüsü taşıdığı kanıtlanamamış olması bakımından diğer keneler kadar tehlikeli olmadığı bilindiği için bu türle yapılan deney ve gözlem sonuçları da çok önemli bulunmamıştır.

Bu çalışma kapsamında, sentezlenen bileşiklerden doğada daha uzun süre kalabilen yeni feromon türevleri elde edilmeye çalışılmıştır. Çünkü orijinal feromonların çoğu uçucu olduğundan dolayı doğada çok uzun kalamamaktadır.

Daha önce yapılan bir makalede çalışmada anilin türevlerinin piperazin ve pirolidin gibi bazlarla kenetlenmesi sonucu elde edilen triazen bileşiklerinin asidik ortamda çok yavaş bozulan maddeler olduğu bulunmuştu [31].

Bu çalışmada da benzer şekilde kenelere ait bazı feromonların anilin türevleri temin edilerek pirolidin, morfolin ve piperidin bazları ile kenetlenmesi sağlanmış ve triazen bileşikleri elde edilmiştir. Böylece elde edilen bileşiklerin doğada yavaş yavaş bozularak feromon özelliğini uzun süre devam ettirmesi ve feromonlu tuzak olarak kullanılması sağlanmış olacaktır.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen ve feromon türevi olduğu düşünülen maddeler kullanılarak kenelerin; insan ve evcil hayvanların yaşamadığı alanlara çekilmesi sağlanabilir ve kenelerin insan sağlığına zarar vermesi engellenebilir.

Ayrıca bu çalışma Türkiye'de yaşayan bu tür keneler üzerinde, yeni feromonların belirlendiği ilk çalışma olacaktır. Aynı zamanda literatüre yeni bileşikler (16 tane) kazandırma bakımından da önem taşımaktadır.

Feromon kullanılarak yapılan biyolojik mücadeleyi diğerlerinden farklı tutan en önemli özellik kitle imha yöntemine gerek kalmamasıdır. Sentezlenen çekici feromonlar sayesinde keneler daha zararsız olabilecekleri yerlere taşınmak üzere veya başka bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere toplanabilecektir.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen bileşikler içerisinde feromon özelliği gösteren maddelerin daha sonra uzman denetiminde, kene bulunması muhtemel sahalarda feromonlu tuzak olarak kullanılması ve etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen feromonların biyolojik mücadeleye kimyasal yönden destek vermesi beklenmektedir. Hatta veterinerlik, ziraat, biyoloji ve tıp alanlarında yapılan benzer çalışmalarda, birlikte hareket edilerek daha kapsamlı araştırmalar yapılabilir.

Ayrıca bu çalışmaya benzer şekilde, insanlar ve hayvanlar için rahatsız edici veya tehlikeli olabilen örümcek ve akrep gibi diğer akarların da feromonları incelenerek onlar için de yeni feromon türleri sentezlenmesi düşünülebilir.

Kaynaklar

- [1] Bursali, A., Keskin, A., & Tekin, S., (2013). Ticks (Acari: Ixodida) infesting humans in the provinces of Kelkit Valley, a Crimean-congo hemorrhagic fever endemic region in Turkey. *Experimental and Applied Acarology volume (59)*, 507-513.
- [2] Beyhan, Y., Mungan, M., & Babur, C. (2014). Yurtdışı Seyahat İlişkili Amblyomma spp. Olgusu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 48-50.
- [3] Dumanli, N., Altay, K., Aktaş, M. (2016). Keneler ve Kenelerle Taşınan Hastalıklar, *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences, Vol.6, No.2.* 45-54.
- [4] Vatansver, Z. (2008). Vektör Kenelerin Ekolojisi, Kene Kaynaklı Enfeksiyonlar. *II. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu*, (s. 27-36). Ankara.
- [5] Vatansver, Z. (2014). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi: Hayvanlarda epidemiyoloji ve kene ile mücadele. *V. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- [6] Gargılı, A. (2009). Kenelerin Vektörlüğü ve Türkiye'de Durum. *Ankem Der.23.Ek2*, 249-252.
- [7] Orkun, Ö., Karaer, Z., Çakmak, A., & Nalbantoğlu, S. (2014). Spotted fever group rickettsiae in ticks in Turkey; Ticks and Tick-borne Diseases. *Elsevier*, 5, 8 (8), 213-218.
- [8] Ergönül, Ö. (2016). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Tedavisi ve Ribavirin Kullanımı. *Klinik Dergisi 29(1)*, 2-9.
- [9] Fakoorziba, M., Naddaf-Sani, A., Moemenbellah-Fard, M., Azizi, K., Ahmadnia, S., & Chinikar, S. (2015). First phylogenetic analysis of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome in naturally infected Rhipicephalus appendiculatus ticks (Acari: Ixodidae). *Springer-Verlag Wien, Arch Virol*, 60, 1197-1209.
- [10] Kazan, F.G, Sümer, H., (2019). Tokat İl Merkezinde Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Ön Tanısıyla Hastanede Yatan Hastaların, KKKA Hastalığı Hakkında Bilgi Düzeyi. *Ankara Medical Journal*, 19(2), 381-395.
- [11] Aydın, M. F., & Coşkun, A. (2019). İnsanlarda Kene ile Bulaşan Hastalık Etkenleri ve Türkiye'deki Mevcut Durumu. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 4(1), 26-32.
- [12] Keskin, A., Keskin, A., Bursali, A., & Tekin, S. (2015). Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing humans in Corum and Yozgat provinces, Turkey. *Experimental and Applied Acarology*, 67, 607-616.
- [13] Özkan, S., & Erdoğan, A. (2012). *Vektörle Bulaşan Enfeksiyonlar, Türkiye Halk Sağlığı Raporu*, 108-122, 2012. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği.
- [14] Elaldı, N. (2014). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. *V. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- [15] THSK. (2016). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Faaliyet Raporu-2016, s.75-76, 27. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı.
- [16] Şener, H. F., & Kırkıncıoğlu, Z. (2014). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Risk Gruplarının Koruyucu Giysi Tercihleri ve Model Tasarımı. *Vocational Education* 9(4), 73-89.
- [17] Galun, R., Prestwich, G., Meinwald, J., Purnell, R., Payne, R., Wood, W., & Leahy, S. (1975). Phenols As Pheromones Of Ixodid Ticks: A General Phenomenon? *J.Chem.Ecol.*, Vol.1, No.4, 501-509.
- [18] Bruyne, M. d., & Guerin, P. (1994). Isolation of 2,6-Dichlorophenol From The Cattle Tick Boophilus Microplus: Receptor Cell Responses But No Evidence For A Behavioural Response. *Journal of Insect Physiology*, v. 40(2), 143-154.
- [19] Silverstein, R., West, J., Sonenshine, D., & Khalil, G. (1983). Occurrence of 2,6-dichlorophenol in hard ticks, Hyalomma dromedarii and Hyalomma anatolicum excavatum, and its role in mating. *Journal of Chemical Ecology*, Vol.9, No.12, 1543-1549.
- [20] Leonovich, S. (2004). Phenol and lactone receptors in the distal sensilla of the Haller's organ in Ixodes ricinus ticks and their possible role in host perception. *Experimental and Applied Acarology*, Vol.32, 89-102.
- [21] Lusby, W., Sonenshine, D., Yunker, C., Norval, R., & Burrige, M. (1991). Comparison of known and suspected pheromonal constituents in males of African ticks, Amblyomma hebraeum Koch and Amblyomma variegatum (Fabricius). *Experimental & Applied Acarology*, Volume 13, Issue 2, 143-152.

- [22] Diehl, P., Guerin, P., Vlimant, M., & Steullet, P. (1991). Biosynthesis, Production Site, and Emission Rates of Aggregation-Attachment Pheromone in Males of Two Amblyomma Ticks. *Published in Journal of Chemical Ecology* 17, issue 5, 833-847.
- [23] Kennedy, K., Carla, C., Lorena, L., Pedro, H., Andrea, C., & Ligia, M. (2012). Chemical composition and biological characterization of extracts of male-produced pheromone from *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) by GC/MS-SIM and behavioural responses. *International Journal of Acarology*, Vol. 38, No.5, 445-453.
- [24] Schöni, R., Hess, E., Blum, W., & Ramstein, K. (1984). The Aggregation-Attachment Pheromone Of The Tropical Bont Tick *A. variegatum* Fabricius (Acari, Ixodidae): Isolation, Identification And Action Of Its Components., *Journal of Insect Physiology*, Volume 30, Issue 8, 613-618.
- [25] Sonenshine, D. (2004). Pheromones And Other Semiochemicals of Ticks and Their Use In Tick Control. D. Sonenshine içinde, *Parasitology* (s. 129). Cambridge University Pres.
- [26] Khalil, G., Nada, S., & Sonenshine, D. (1981). Sex Pheromone Regulation Of Mating Behavior In The Camel Tick, *Hyalomma Dromedarii* (Ixodoidea: Ixodidae). *J. Parasitol.* 67(1), 70-76.
- [27] Özçelik Doğan, Ş., Özçelik H., (2017). Chemical composition analyses of fruit Roses/Rosehips (*Rosa* spp.) of Türkiye. *Biological Diversity and Conservation* (10/2), 122-140.
- [28] Akyazı, R., & Altunç, Y. E. (2018). Akarlarda Feromonlar. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 185-205.
- [29] Kar, S., Güven, E., & Karaer, Z. (2008). Ankara'da Şubat Ayında Babesiosis Olgusu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32 (4):, 379-381.
- [30] Hoşgör, M., Bilgiç, H.B., Bakırcı, S., Ünlü, A. H., Karagenç, T., & Eren, H. (2015). Aydın Yöresinde Sığırlarda ve Kenelerde Anaplasma / Ehrlichia. *Turkiye Parazitol Derg.* 39, 291-8.
- [31] Yanarates, E., Disli, A., & Yildirir, Y. (1999). New N,N'-Bis (Substituted Phenylazo) Piperazines and Their Cleavage Reactions in Acetic Acid. *Organic Preparations and Procedures International*, 31: (4), 429-433.
- [32] Akar, A.; Çalışkan, Ö. A.; Ay, M.; Doğan, Ö.; Gülce, A.; Gümrükçüoğlu, İ., ... Yusuföğlu, A. (2014). Organik Kimya, "Yaşamın Kalbi", 2. Baskı, Editör: Yılmaz Yıldırım. Ankara: Bilim Yayıncılık.

(Bu çalışma Erkan YANARATEŞ'in doktora tezinden türetilmiştir.)

(Received for publication 20 November 2019; The date of publication 15 December 2019)