

Dirofilaria immitis*'in ergin ve mikrofilierlerinin somatik ve salgısal antijenlerinde spesifik proteinlerin belirlenmesi ve glikoprotein varlığının araştırılması

**Serap ÜNÜBOL AYPAK¹, Ayşegül BİLDİK¹, Süleyman AYPAK², Hakan SARALI³,
Tuğçe BAYHAN⁴**

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı; ²Parazitoloji Anabilim Dalı; ³ Koçarlı İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü; ⁴ Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Aydın, Türkiye.

Özet: Bu çalışmada, *Dirofilaria immitis*'in ergin ve mikrofilierlerinin somatik ve E/S proteinleri SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. Ayrıştırılan proteinlerden hangilerinin hastalığa spesifik antijenler içerdiği immunblotting yöntemiyle belirlendi. Antijenik glikoproteinler ise glikan kitleleriyle belirlendi. Parazitin ergin formunun somatik ve E/S antijenleri ile yapılan immunblotting sonucunda; 69, 20, 18, 16, 14, 12 kDa'luk proteinlerin ortak şekilde spesifik olduğu, erginlerde (somatik antijen); 20, 18, 16 kDa'luk proteinlerin, ergin salgısal ürünlerinde (E/S antijen); 18 ve 16 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu belirlendi. Mikrofilierlerinin somatik ve salgısal antijenleri ile yapılan immunblotting sonucunda; 16, 14 ve 12 kDa'luk proteinlerin ortak şekilde spesifik olduğu, bunlardan mikrofilierlerde ve mikrofilierlerin salgısal ürünlerinde 14 ve 16 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu belirlendi. Parazitin bütün formlarında, spesifik antijenlerin şeker içeriklerindeki çok küçük farklılıklar dışında genel olarak mannoz, siyalik asit ve galaktoz bulunduğu tespit edildi. Parazitlerin antijenik yapıdaki glikoproteinlerinin belirlenmesi, konak-parazit arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına ve yapılacak olan aşı çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: *Dirofilaria immitis*, E/S antijen, glikoprotein, mikrofilier, spesifik protein.

Determining specific proteins in somatic and excretory/secretory antigens of adult and microfilariae of *Dirofilaria immitis* and investigation of glycoprotein occurrence

Summary: In this study, somatic and secretional proteins of adult and microfilariae of *Dirofilaria immitis* were separated with SDS-PAGE. Which separated proteins include specific antigens to the disease was determined with immunblotting technique. Antigenic glycoproteins were determined with glycan kits. According to the immunblotting results which were obtained by somatic and excretory/secretory (E/S) antigens of adult form of parasite it has determined that: 69, 20, 18, 16, 14, 12 kDa proteins are commonly specific, in adults (somatic antigen); 20, 18, 16 kDa proteins, adult E/S products; 18 and 16 kDa proteins are glycoproteins. According to the immunblotting results which were obtained by somatic and E/S antigens of microfilariae it has determined that 16, 14 and 12 kDa proteins are commonly specific, in microfilariae and E/S products of microfilariae 14 and 16 kDa proteins are glycoproteins. In all forms of parasite generally mannose, sialic acid and galactose were seen except small differences in sugar ingredients of specific antigens. Determining antigenic structured glycoproteins of parasites will provide clarify of relation between host parasite and also will provide contribution to the vaccine studies.

Keywords: *Dirofilaria immitis*, excretory/secretory antigen, glycoprotein, microfilariae, specific protein.

Giriş

Dirofilariyozis, *Dirofilaria* cinsine bağlı filarial nematodların sebep olduğu, sivrisinekler tarafından nakledilen bir hastalıktır. Son konakları başta primat ve karnivorlar olmak üzere çeşitli memelilerdir. *Dirofilaria* cinsine bağlı nematodlar hemen hemen tüm dünyada görülen, bazen gizli seyir gösteren, hem insan hem de köpekler için

risk oluşturan zoonoz nematodlardır (6, 21, 27). Köpeklerde en yaygın olarak görülen ve insanlarda hastalık yapabilen iki önemli türden biri olan *Dirofilaria immitis*, köpek, kedi, tilki, kurt gibi karnivorlarda, bazen de insanda yerleşerek önemli sistemik bozukluklara sebep olur (27). Bu nematodun erişkinleri köpeklerin sağ ventrikulusu ve pulmoner arterlerine yerleşerek pulmoner sirkülasyon,

* Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-12005 nolu proje ile desteklenmiştir.

kalp, karaciğer ve böbreklerde fonksiyonel bozukluklara yol açmakta, mikrofilerleri (MF) ise perifer kanda yaşamaktadır (1, 14, 27). Değişik sokucu sinekler *Dirofilaria* türlerine ara konaklık yaparlar. Bunlar enfekte hayvanlardan kan emmek suretiyle mikrofilerleri alarak, başka hayvanlara bulaştırırlar (6).

SDS-PAGE ve Western blotting teknikleri son yıllarda parazitoloji alanında sıkça kullanılmaktadır. İmmunblotting tekniğinin paraziter hastalıkların tanısında son derece hassas ve spesifik sonuçlar verdiği bildirilmekte, testin çapraz reaksiyon riskini önemli oranda azalttığı, erken teşhis için çok önemli bir basamak teşkil ettiği kaydedilmektedir (17).

Bazı protozoal ve helmantik parazitler, parazitizmlemini sağlamak için genellikle antijenik olan ve konağa invazyonda gerekli olan karbonhidrat bağlı proteinlere (glikoprotein) ihtiyaç duyarlar (30). Protein glikozilasyonu proteinlerin en yaygın posttranslasyonel modifikasyonu olup, proteinin antijenik özelliklerine katkıda bulunur. Glikoprotein ya da glikolipidlerin içerisinde bulunan glikanlar helmintlerin yüzeylerinde ya da E/S (salgısal) ürünlerinde bol miktarda bulunur ve genellikle çok antijeniktir; alışılmışın dışında monosakkaritler ya da alışılmış monosakkaritlerin alışılmamış bağlarını içerebilir. Helmintlerin sentezlediği bu alışılmadık glikanlar konak immün sistemden uzun süre kaçmaya yarar. Adaptif immunitede dendritik hücrelerin anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Dendritik hücrelerin üzerinde bulunan C-tipi lektinler patojen glikanlarını tanı ve bağlar. Bu durumdan kurtulmak için helmintler hedeflerindeki dendritik hücrelere, yüzeylerindeki glikanları değiştirerek "glikan hilesi" yaparlar. Böylece pek çok inflamatuvar cevabın düzenlenmesine katkıda bulunarak immün modülasyona sebep olurlar (7). Parazit glikoproteinlerin detaylı analizleri konak-parazit arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına, böylece immün cevabın araştırılmasındaki eksik bilgilerin tamamlanmasına yardımcı olur (29).

Bu çalışmanın amacı, *D. immitis*'in ergin ve mikrofilerlerinin somatik ve salgısal antijenlerindeki spesifik proteinleri belirlemek ve spesifik proteinlerden hangilerinin glikoprotein olduğunu ve bu glikoproteinlerin hangi şekerleri içerdiğini tespit etmektir.

Materyal ve Metot

Bu çalışma için Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Onay numarası: B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050. 04/2010/094).

Çalışmada kullanılacak materyali, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda konuyla ilgili daha önce yapılmış bir tez çalışmasından elde edilmiş parazitin ergin ve larvaları ile bu parazitlerin toplandığı hayvanlardan elde edilen serumlar oluşturmuştur. Söz konusu tez çalışması sırasında, dört

adet *D. immitis*'le enfekte köpekten kan alınmış, 3000 rpm'de santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Köpeklerin otopsilere sonucu elde edilen *D. immitis* ergin dönemleri ve bu köpeklerin kanlarından elde edilen mikrofilerleri RPMI 1640 besi yeri içinde yaşadıkları süre boyunca (8-10 gün) tutarak E/S antijenleri elde edilmiştir. Ergin ve larva dönemi (L-1) aşamasındaki parazitlerin kendileri, içinde yaşatıldıkları besi yeri ile birlikte E/S antijenleri ve serumlar, analizlere kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Somatik antijenlerin hazırlığı için -80°C'de bekleyen ergin parazitler ve larvaları olan mikrofilerler (L1) ısıya dayanıklı iki ayrı havan içerisine konularak, çözülmelerine izin verilmeden üzerlerine sıvı azot ilave edildi. Sıvı azotun uçmasıyla beraber ileri derecede donmuş olan parazitler ve larvaları havan tokmağı ile dövülerek toz haline getirildi. Proteaz inhibitörleri ilave edilerek vortekle iyice karıştırıldı. Daha sonra 13000 rpm'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant, diyaliz torbasına konularak +4°C'de 24 saat diyaliz edildi. Hazırlanan parazit antijenleri 0,45 µm'lik membran filtreden geçirilecek ve -80°C'de saklandı (20). Salgısal antijenler için herhangi bir ön hazırlık yapılmayıp, parazitlerin içinde yaşatıldığı besi yerleri direkt olarak kullanıldı.

Daha önceden kullanıma hazır hale getirilmiş ve -80°C'de bekleyen parazit antijenleri çözdürüldü ve protein miktarları Lowry yöntemi ile ölçüldü (15). Parazit antijenlerine ait protein profillerini belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı (13, 31). Elektroforez işleminden sonra jeller Blue Silver boya çözeltisi ile boyandı (5). SDS-PAGE sonucunda görülen bantların molekül ağırlıkları moleküler imaj yazılımı ile hesaplandı. Antijenik yapının belirlenmesi amacıyla Burnie ve ark. (4) tarafından bildirilen immunblotting (Western blotting) yöntemi kullanıldı. İmmunblotting (IB) sonucunda görülen bantların molekül ağırlıkları moleküler imaj yazılımı ile hesaplandı. Kist hidatik proteinlerindeki glikoprotein varlığının belirlenmesi ve ayırt edilmesi amacıyla glikan tayin ve glikan ayırt etme kiti kullanıldı. SDS-PAGE'den sonra proteinler polivinil diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Membran üzerinde glikoprotein varlığı ve ayırımı üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Glikoproteinlerin ayırt edilmesi için glikan ayırt edici kit içerisinde bulunan spesifik lektinlerden yararlanıldı (Tablo). Oluşan bantların molekül ağırlıkları moleküler imaj yazılımı ile hesaplandı.

Bulgular

D. immitis ergin formunun salgısal antijenleri ile yapılan SDS-PAGE ve IB sonuçları: SDS-PAGE ile 249 ila 12 kDa arasında 20 adet protein bandı tespit edildi. Hasta köpek serumlarıyla yapılan immunblotting sonucunda 185 ila 12 kDa arasında 14 antijenik bant (185, 117, 101, 69, 63, 53, 36, 27, 25, 20, 18, 16, 14, 12 kDa) belirlendi. Bu bantlardan sekiz tanesi (185, 117, 101, 63, 53, 36, 27, 25

Tablo. Çeşitli *D. immitis* antijenlerinin protein ve glikoprotein analizlerine ait sonuçlar.
Table. Results of the protein and glycoprotein analysis of varrious *D. immitis* antigens.

EESA		ESOA		MESA		MSOA	
İB	LB	İB	LB	İB	LB	İB	LB
185		185		180		192	
117		112				156	
101		100				115	
69	GNA	69	GNA	72	SNA ve DSA	72	SNA, DSA, MAA
63		63		63	DSA	48	
53		47	GNA	48			
36	SNA	36	GNA ve SNA	36	SNA	36	SNA
27		27					
25		25		25		25	
20*		20*	GNA				
18*	GNA	18*	GNA				
16*	SNA	16*	GNA	16*	SNA	16*	GNA ve SNA
14*		14*		14*	GNA	14*	GNA
12*		12*		12*		12*	

EESA: Ergin E/S antijeni, ESOA: Ergin somatik antijeni, MESA: Mikrofilerlerin E/S antijeni, MSOA: Mikrofilerlerin somatik antijeni, İB: İmmunblotting, LB: Lektinblotting, MAA: *Maackia amurensis agglutinin*, GNA: *Galanthus nivalis agglutinin*, SNA: *Sambucus nigra agglutinin*, DSA: *Datura stramonium agglutinin*. *Spesifik proteinler.

EESA: Adult E/S antigen, ESOA: Adult somatic antigen, MESA: Microfilariae E/S antigen, MSOA: Microfilariae somatic antigen, İB: İmmunoblotting, LB: Lectinblotting, MAA: *Maackia amurensis agglutinin*, GNA: *Galanthus nivalis agglutinin*, SNA: *Sambucus nigra agglutinin*, DSA: *Datura stramonium agglutinin*. *Specific proteins.

kDa) ticari olarak temin ettiğimiz non enfekte köpek serumuyla yaptığımız immunblotting ile tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda 69, 20, 18, 16, 14 ve 12 kDa'luk proteinlerin hastalığa spesifik proteinler olduğu düşünülmektedir.

D. immitis ergin formunun somatik antijenleri ile yapılan SDS PAGE ve immunblotting sonuçları: SDS-PAGE ile 225 ila 12 kDa arasında 22 adet protein bandı tespit edildi. Hasta köpek serumlarıyla yapılan immunblotting sonucunda 185 ila 12 kDa arasında 14 tane antijenik bant (185, 112, 100, 69, 63, 47, 36, 27, 25, 20, 18, 16, 14, 12 kDa) belirlendi. Bu bantlardan sekizi (185, 112, 100, 63, 47, 36, 27, 25 kDa) ticari olarak temin ettiğimiz non enfekte köpek serumuyla yaptığımız IB ile tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda 69, 20, 18, 16, 14, 12 kDa'luk proteinlerin hastalığa spesifik proteinler olduğu düşünülmektedir.

D. immitis mikrofilerlerinin E/S antijenleri ile yapılan SDS-PAGE ve IB sonuçları: SDS-PAGE ile 206 ila 12 kDa arasında 24 adet protein bandı tespit edildi. Hasta köpek serumlarıyla yapılan IB sonucunda 220 ila 12 kDa arasında dokuz antijenik bant (180, 71, 63, 48, 35, 25, 16, 14, 12 kDa) belirlendi. Bu bantlardan altısı (180, 71, 63, 48, 35, 25 kDa) ticari olarak temin edilen non enfekte köpek serumuyla yapılan IB ile tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda 16, 14 ve 12 kDa'luk proteinlerin spesifik olduğu düşünülmektedir.

D. immitis mikrofilerlerinin somatik antijenleri ile yapılan SDS-PAGE ve immunblotting sonuçları: SDS-PAGE ile 218 ila 12 kDa arasında 16 adet protein bandı tespit edildi. Hasta köpek serumlarıyla yapılan IB sonucunda 192 ila 12 kDa arasında 11 tane antijenik bant (192, 156, 115, 72, 48, 39, 36, 25, 16, 14, 12 kDa) belirlendi. Bu bantlardan sekizi (192, 156, 115, 72, 48, 39, 36, 25 kDa) ticari olarak temin edilen enfekte olmayan köpek serumuyla yapılan immunblotting ile tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda 16, 14 ve 12 kDa'luk proteinlerin spesifik olduğunu düşünülmektedir.

D. immitis erginlerinin E/S antijenleri ile yapılan glikoprotein analizi sonuçları: Glikan kitleriyle yapılan lektinblotting sonucunda; 69 ve 63 ve 18 kDa'luk proteinin mannoz içerdiği, 36 ve 16 kDa'luk proteinin mannoz, siyalik asit ve galaktoz içerdiği tespit edilmiştir.

D. immitis erginlerinin somatik antijenleri ile yapılan glikoprotein analizi sonuçları: Lektinblotting sonucunda; 69, 47, 20 ve 18 proteinlerin mannoz içerdiği, 36 kDa'luk proteinin, mannoz, siyalik asit ve galaktoz içerdiği, 16 kDa'luk proteinin mannoz, siyalik asit ve galaktoz içerdiği tespit edilmiştir.

D. immitis mikrofilerlerinin E/S antijenleri ile yapılan glikoprotein analizi sonuçları: Lektinblotting sonucunda; 72 kDa'luk proteinin siyalik asit, galaktoz ve N-asetil galaktozamin, 63 kDa'luk proteinin, galaktoz ve N-asetil galaktozamin, 35 kDa'luk proteinin siyalik asit ve

galaktoz, 16 kDa'luk proteinin siyalik asit ve galaktoz, 14 kDa'luk proteinin mannoz içerdiği tespit edilmiştir.

D. immitis mikrofilerlerinin somatik antijenleri ile yapılan glikoprotein analizi sonuçları: Lektinblotting sonucunda; 72 kDa'luk proteinin siyalik asit, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdiği, 35 kDa'luk proteinin siyalik asit ve galaktoz içerdiği, 16 kDa'luk proteinin mannoz, siyalik asit, galaktoz, 14 kDa'luk proteinin mannoz içerdiği tespit edilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, *D. immitis*'in ergin ve mikrofilerlerinin somatik ve salgısal antijenlerindeki spesifik proteinler belirlenmiş, spesifik proteinlerden hangilerinin glikoprotein olduğu araştırılmış ve bu glikoproteinlerin hangi şekerleri içerdiği tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında *D. immitis* erginlerinde E/S antijenlerine ilişkin az sayıda çalışma (2, 11), somatik antijenlerine ilişkin daha çok sayıda çalışma (3, 16, 17, 19, 25) yapılmış olduğu görülmüştür.

Kaneko ve ark. (11) *D. immitis*'in ergin kültüründen elde ettikleri E/S antijenleri ile SDS-PAGE ve IB yapmışlar, erkek ve dişi parazitlerin E/S antijenleriyle yapılan SDS-PAGE sonucunda coomassie ve gümüş boyamalarla sırasıyla 16 ve 21 bant elde etmişlerdir. Doğal enfekte *D. immitis*'li köpeklerden alınan serumlar kullanılarak yapılan IB sonucunda 20, 38, 43, 53, 63, 90 110 125 ve 136 kDa'luk bantların F-ES (dişi) için, 39 ve 44 kDa'luk bantların M-ES (erkek) için spesifik olduğunu, 14, 18, 21 22, 29 ve 32 kDa'luk bantların ise F-ES ve M-ES için ortak olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda erkek ve dişi parazit ayrımı yapılmayıp muhtemelen antijen hazırlarken her iki parazitten de kullanıldığı için her iki cinsiyete ait antijenik bantlar gözlemlendi. 63, 53, 18, 14 kDa'luk antijenik bantların tamamen ortak olduğu, 39, 44 ve 21 kDa'luk bantların, 36, 47 ve 20 kDa'luk bantlarımızla benzer olduğu görülmüştür.

Akao ve ark. (2) *D. immitis*'in ergin E/S antijenlerini kullanarak, pulmoner dirofilariozisli yedi hasta serumu kullanarak immunblotting yapmışlar, altı hastada 20-19,5, 17,5-17 ve 14 kDa'luk proteinlere karşı antikor cevabın geliştiğini gözlemişlerdir. 18 kDa'luk E/S antijeninin, sadece Dirofilaryalı hasta serumlarıyla değil, non filarial hasta ve kontrol serumlarıyla da kuvvetli kros reaksiyon verdiğini bildirmişler, *D. immitis*'in ergin E/S antijeninin somatik antijenine göre daha duyarlı olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda, 20 kDa'luk protein spesifik olarak belirlenmiş olup, Akao ve ark (2)'nin spesifik olarak belirlediği 17 ve 14 kDa'luk proteinlerin, spesifik olarak belirlediğimiz 16 ve 12 proteinler olabileceği düşünülmektedir.

Boto ve ark. (3) *D. immitis*'in erişkin formunun deterjanla ekstrakte edilmiş antijenleri ile yaptıkları immunblotting sonucunda enfeksiyondan sonraki 3. ayda

200, 130, 100, 80 ve 25 kDa'luk proteinlere karşı, enfeksiyondan sonraki 6. ayda ise 38, 21 ve 15 kDa'luk proteinlere karşı antikor cevabı geliştiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda doğal enfekte köpeklerden yararlandığımız için enfeksiyonun yaşını bilmemekle birlikte, küçük molekül ağırlıklı antijenik proteinlerimizin çok benzer olması enfeksiyonun ilerlemiş olduğuna işaret etmektedir.

Scott ve ark. (23) erkek ve dişi ergin *D. immitis*'lerdeki yüzey antijenlerini IODO-GEN- aracılı yüzey işaretleme metoduyla belirlemişler, 14.5, 16, 17.5, 20 ve 49 kDa'luk proteinlerin antijenik olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızda da bu proteinler antijenik olarak tespit edilmiştir.

Song ve ark. (25) *D. immitis*'le deneysel olarak enfekte ettikleri üç köpekten, enfeksiyondan sonraki 30. haftada kan almışlar ve bu köpeklere sırayla 30, 36 ve 37. haftalarda ötenazi yapmışlardır. 1. köpekte; 24, 70, 80 ve 110 kDa, 2. köpekte; 22, 72, 74 kDa, 3. köpekte 58 ve 72 kDa'luk proteinlere karşı antikor cevabı geliştiğini bildirmişlerdir. Farklı haftalarda farklı antijenik bantların görülmesi, ancak 70-72 kDa'luk bantın ortak olması, bu bantın spesifik olarak bildirdiğimiz 69 kDa'luk bantla aynı bant olduğunu göstermektedir.

Song ve ark. (26) bir diğer çalışmada, *D. immitis*'le enfekte köpeklerden 4. gömlek değiştirme (9-11 hafta) ve mikroflaremi (25-30 hafta) döneminde aldıkları serumların *T. canis* ham ekstraktıyla güçlü reaksiyon verdiğini göstermişlerdir. *T. canis*'in 44, 57, 88 ve 100 kDa'luk antijenik fraksiyonları *D. immitis*'li köpek serumlarıyla pozitif reaksiyon vermiştir. Biz de bu bantlara spesifik olarak tespit ettiğimiz proteinler içinde rastlamadık.

Öge ve ark. (17) *D. immitis* ile doğal enfekte, 4-9 yaşları arasındaki köpeklerle yapmış oldukları çalışmada SDS-PAGE'de ergin dişi parazitlerde 28 bant, ergin erkek parazitlerde 33 bant gözlemişlerdir. Yapılan immunblotting analizi sonucunda dişi ve erkek parazitlere ait, 85, 66, 42, 20, 16.2 ve 14.5 kDa ağırlığındaki protein bantlarının hastalığa spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Biz bu bantlardan 85 kDa olanı antijenik olarak gözleyemezken, yakın bantlar olan 69 ve 47 kDa'luk bantları IB ile tespit etmemize rağmen bunları kontrol serumuyla yaptığımız IB sonucunda da gördük. Bunun dışında 20, 16 ve 14 kDa'luk bantlar spesifik olarak tespit edildi.

Pou-Barretto ve ark. (19) *D. immitis*'in somatik antijenlerini kullanarak, yüksek ve normal seviyelerde immunoglobulin E içeren 467 insan serumuyla yaptıkları çalışmada 33 ve 42 kDa'luk antijenik proteinleri kütle spektrometri yöntemiyle tanımlamışlar, 33 kDa'luk olanın galektin, 42 kDa'luk olanın aldolaz olduğunu bildirmişlerdir. Bunların da antijenik olarak belirlediğimiz 36 ve 47 kDa'luk bantlarla benzer olduğu görülmüştür.

Oleaga ve ark. (16) *D. immitis*'in erişkin formunun somatik antijenlerini kullanarak yaptıkları 2 D elektrofores ve mf (-) ve mf (+) köpek serumları kullanarak yaptıkları immunblotting sonucunda toplam 31 adet antijenik

nokta tespit etmişler; 99, 70, 60, 55, 48, 47, 39, 37, 32, 27 kDa'luk proteinleri Maldı TOFF- MS ile karakterize etmişlerdir. Tespit ettiğimiz 47 kDa'luk bant bu çalışmada bulunanla birebir aynı, 60 ve 37 kDa'luk bantlar ise 63 ve 36 kDa'luk bantlarımızla benzerdir.

D. immitis'in L-1 formunun E/S antijenlerinin spesifik proteinlerine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Frank ve ark. (8) parazitin L-3 ve L-4 formunun antijenik proteinlerinden 20.5 ve 22 kDa'luk proteinlerin spesifik olduğunu belirtmişler, aynı araştırmacılar 1996 yılında bu proteinleri pürifiye ve karakterize etmişlerdir.

Parazitin mikrofilerlerinin spesifik proteinlerine ilişkin ulaşabildiğimiz literatür sayısı son derece sınırlı olup, Tamashiro ve ark. (28) *D. immitis* MF'lerinin yüzey antijenlerini radyoionizasyon tekniğiyle tanımlamışlar, 16 ve 14 kDa'luk proteinlerin spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda 16 ve 14 ve 12 kDa'luk bantlar spesifik olarak tespit edilmiştir.

Philipp ve Davis (18) *D. immitis* L-3'lerin 35 kDa'luk bir yüzey antijeni karakterize etmişlerdir. Çalışmamız ile bu proteinin antijenik olduğu doğrulanmış aynı zamanda bir glikoprotein olduğu da anlaşılmıştır.

Scott ve ark. (23) *D. immitis* L-2, L-3 ve L-4'ün yüzey ilişkili antijenlerini de incelemişler, L-2 ve L-3'ün yaklaşık 66, 48, 25, 16,5 ve 12 kDa'luk antijenik proteinlerini bildirmişlerdir. Böylece L-1'lerde 16 ve 12 kDa'luk proteinlerin ortak olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda özellikle parazitin erişkin formunun somatik antijenlerini kullanarak tespit ettiğimiz antijenik proteinleri pek çok araştırmacının da antijenik olarak belirlediğini görmekle birlikte çalışmamızla birebir paralellik arz eden bir araştırmaya rastlanmamıştır. Kaldı ki diğer araştırmacıların bulguları da bazı benzerlikler içermesi yanında birbiriyle örtüşmemektedir. Bu tip araştırmalarda spesifitede görülen farklılıkların antijen hazırlama şekline bağlı olabileceği (24), gözlenen değişik sonuçların; değişen teknikler, ölçme ve değerlendirme metodlarındaki gelişmelerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (29).

Yine erişkin formun salgısal antijenlerini kullanarak tespit ettiğimiz antijenik proteinler de ulaşabildiğimiz az sayıdaki literatür (2, 11) ile benzerlikler göstermektedir. Parazitin larva formunun somatik antijenlerine ilişkin benzer birkaç çalışmaya (18, 23, 28) ulaşılmış olup, mikrofilerlerin salgısal antijenlerine ilişkin benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu parazitin glikoproteinleriyle ilgili yapılmış olan birkaç çalışmada (10, 12, 22) glikoproteinler yapısal yönünden incelenmiş olup, antijenik proteinler içerisinde hangilerinin glikoprotein olduğuna ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Scott ve ark. (22) IODO-GEN aracılı yüzey işaretleme metodu ile *D. immitis* ergin parazitin yüzey ilişkili proteinlerini incelemişler, 20 ve 49 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda 47 kDa olarak tespit ettiğimiz, GNA lektiniyle bağlanan ve

mannoz içeren glikoprotein, Scott ve ark. (22)'nin tespit ettiği 49 kDa'luk glikoprotein olduğu düşünülmektedir. Yine 20 kDa'luk glikoprotein de GNA lektiniyle bağlanan ve mannoz içeren bir glikoprotein olduğu doğrulanmıştır.

Kadirpaşaoğlu ve ark. (10) köpek kalp kurdu yüzey glikoproteinlerini fluorescein isothiocyanate-conjugated lektin bağlanma patterniyle kısmen karakterize etmişlerdir. Glikokaliksin terminal rezidüleri arasındaki tamamlayıcı şekerlerin alfa D-glukozil ve/veya alfa D-mannozil, beta galaktozil, N-asetil neuraminik (siyalik asit) olduğunu söylemişlerdir. Çalışmamızda da, *D. immitis*'in ergin ve mikrofilerlerinde, mannoz, galaktoz ve siyalik asit bulunduğu gösterilmiştir.

Kang ve ark. (12) *D. immitis* mikrofilerleri tarafından sentezlenen yüksek mannoz asparajin bağlı oligosakkaritleri karakterize etmişlerdir. Çalışmamızda parazitin incelediğimiz her türlü formunda mannoz şekerinin olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızı genel olarak değerlendirdiğimizde, parazitin ergin formunda ve ergin formunun salgısal ürünlerinde spesifik proteinlerin aynı olduğu (69, 20, 18, 16, 14, 12 kDa) gözlemlenmiştir. Bu spesifik proteinlerden ergin parazitte 20, 18 ve 16 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu belirlenmiş ancak, 20 kDa'luk protein, ergin parazitin salgısal ürünlerinde spesifik olarak belirlenmesine rağmen glikoprotein olmadığı görülmüştür.

Parazitin mikrofilerlerine ve mikrofilerlerin salgısal ürünlerine baktığımızda bunların da ortak spesifik proteinler içerdiği (16, 14, 12 kDa), bu spesifik proteinlerden 14 ve 16 kDa'luk olanlarının glikoprotein olduğu, ancak, mikrofilerin salgısal ürünlerindeki 16 kDa'luk proteinin mikrofilerden farklı olarak mannoz içermediği görülmüştür.

Dirofilaryozis'e karşı henüz etkili bir aşı geliştirilememiştir (9). İmmunitede son derece önemli rolleri olduğu bilinen glikoprotein yapıdaki spesifik antijenler, parazitin özellikle konak immün sisteminden glikan hilesi yaparak kaçmasını sağlayan araçlarıdır. Bu doğrultuda parazitlerin antijenik yapıdaki glikoproteinlerinin ve şeker yapılarının belirlenmesi, konak-parazit arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına ve yapılacak olan aşı çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. **Anderson RC** (2000): *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission*. 2nd Edition, CABI Publishing, New York.
2. **Akao N, Kondo K, Fujita K** (1991): *Immunoblot analysis of *Dirofilaria immitis* recognized by infected humans*. Ann Trop Med Parasitol, **85**, 455-460.
3. **Boto WMO, Powers KG, Levy DA** (1984): *Antigens of *Dirofilaria immitis* which are immunogenic in the canine hosts: Detection by immunostaining of protein blots with the antibodies of occult dogs*. J Immunol, **133**, 975-980.

4. **Burnie JP, Holland, M, Matthews RC ve ark.** (1987): *Role of immunoblotting in the diagnosis of culture negative and enterococcal endocarditis.* J Clin Pathol, **40**, 1149-1158.
5. **Candiano G, Bruschi M, Musante L ve ark.** (2004): *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.* Electrophoresis, **25**, 1327-1333.
6. **Doğanay A, Şahal M** (1987): *Türkiye’de köpeklerdeki dirofilariasis sorunu ve insan sağlığı yönünden önemi.* Ankara Üniv Vet Fak Derg, **34**, 277-287.
7. **Die I, Cummings RD** (2010): *Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response.* Glycobiology, **20**, 2-12.
8. **Frank GR, Tripp CA, Grieve RB** (1996): *Molecular cloning of a developmentally regulated protein isolated from excretory-secretory products of larval Dirofilaria immitis.* Mol Biochem Parasitol, **75**, 231-240.
9. **Godel C, Kumar S, Koutsovoulos G ve ark.** (2012): *The genome of the heartworm, Dirofilaria immitis, reveals drug and vaccine targets.* FASEB J, **26**, 4650-61. Doi: 10.1096/fj.12-205096.
10. **Kadirpaşaoğlu KA, Bilge FH, Baier RE** (1993): *Determination of the role of cuticular carbohydrates in the hemocompatibility of Dirofilaria immitis (Nematoda).* J Biomed Mater Res, **27**, 207-216.
11. **Kaneko H, Hayasaki M, Ohishi İ** (1990): *Antigenic identification of excretory-secretory products of adult Dirofilaria immitis.* Nippon Juigaku Zasshi, **52**, 995-1000.
12. **Kang S, Cummings RD, McCall JW** (1993): *Characterisation of the N-linked oligosaccharides in glycoproteins synthesized by microfilarie of Dirofilaria immitis.* J Parasitol, **79**, 815-828.
13. **Laemmli K** (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, **227**, 680-685.
14. **Lombard CW** (1987): *Heartworm Disease.* 275-299. In: Bonagura JD. (Ed), Cardiology. 2nd Edition, Churchill Livingstone, New York.
15. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL ve ark.** (1951): *Protein measurement with the folin phenol reagent.* J Biol Chem, **193**, 265-275.
16. **Oleaga A, Pérez-Sánchez R, Pagés E ve ark.** (2009): *Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (Dirofilaria immitis) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections.* Mol Biochem Parasitol, **166**, 134-141.
17. **Öge H, Öge S, Yıldırım A ve ark.** (2005): *İmmunoblotting analysis of somatic components of Dirofilaria immitis.* Parasite, **12**, 179-182
18. **Philipp M, Davis TB** (1986): *Biochemical and immunologic characterization of a major surface antigen of Dirofilaria immitis infective larvae.* J Immunol, **6**, 2621-2627.
19. **Pou-Barreto C, Quispe-Ricalde MA, Morchón R ve ark.** (2008): *Galectin and aldolase-like molecules are responsible for the spesific IgE response in humans exposed to Dirofilaria immitis.* Parasit Immunol, **30**, 596-602.
20. **Sambrook J, Fritsh EF, Manniatis T** (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York.
21. **Sarnıç H, Alkan M** (1986): *Köpeklerdeki dirofilariosis olguları ve insan sağlığı yönünden önemi.* Türkiye Parazitoloj Derg, **2**, 169-174.
22. **Scott AL, Diala C, Moraga DA ve ark.** (1988): *Dirofilaria immitis: Biochemical and immunological characterization of the surface antigens from adult parasites.* Exp Parasitol, **67**, 307-23.
23. **Scott AL, İbrahim MS, Tamashiro WK** (1990): *Surface associated antigens of second, third and fourth stage larvae of Dirofilaria immitis.* Acta Trop, **47**, 339-359.
24. **Sbihi Y, Jansen D, Osuna A** (1996): *Serologic recognition of Hydatid cyst antigens using different purification methods.* Diagn Microbiol Infect Dis, **24**, 205-211.
25. **Song KH, Hayasaki M, Chohig C ve ark.** (2002): *İmmunological responce of dogs experimentaly infected with Dirofilaria immitis.* J Vet Sci, **3**, 109-114.
26. **Song KH, Lee SE, Hayasaki M** (2003): *Seroprevalance of canine dirofilariosis in South Korea.* Vet Parasitol, **114**, 231-236.
27. **Soulsby EJJ** (1982): *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals.* 7th ed. Bailliere Tindal, London.
28. **Tamashiro WK, Ehrenberg JP, Levy DA ve ark.** (1986): *Antigenic peptides on the surface of Dirofilaria immitis microfilarie.* Mol Biochem Parasitol, **18**, 369-376.
29. **Ünübol Aypak S, Uysal H** (2014): *Koyun ve farelerde kist hidatik proteinlerinin karşılaştırmalı analizi ve antijenik proteinlerde glikoprotein varlığının değerlendirilmesi.* Ankara Üniv Vet Fak Derg, **61**, 243-248.
30. **Varki A Cummings R, Esko J ve ark.** (1999): *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New york.
31. **Zingales B** (1984): *Analysis of proteins by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.* In: Genes and Antigens of Parasites. C.M. Marel Ed., Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 357-363.

Geliş tarihi: 20.11.2015 / Kabul tarihi: 13.04.2016

Yazışma adresi:

Yrd.Doç.Dr. Serap Ünübol Aypak
Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Işıkli, Aydın, Türkiye.
e-posta: serapunubol@yahoo.com