

# Koyun ve farelerde kist hidatik proteinlerinin karşılaştırmalı analizi ve antijenik proteinlerde glikoprotein varlığının değerlendirilmesi<sup>1\*</sup>

Serap ÜNÜBOL AYPAK<sup>1</sup>, Hamdi UYSAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. Aydın; <sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. Ankara.

**Özet:** Bu çalışmada koyun ve farelerde kist hidatik proteinlerinin, antijenik proteinler ve antijenik glikoproteinler yönünden karşılaştırılması amaçlandı. Bu amaçla 20'şer adet enfekte ve 10'ar adet sağlıklı koyun ve fare kullanıldı. Hidatidozisli koyunlardan ve deneysel enfekte farelerden elde edilen kist sıvısı, kist membranı ve protoskolekslere ait proteinler Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile ayırt edildi. Ayırt edilen proteinlerden hangilerinin hastalığa spesifik antijenler içerdiği immunblotting tekniği ile belirlendi. Koyun kist sıvısı, membran ve protoskolekslerde 116 kDa ile 26 kDa arasında, fare kist sıvısı ve membranlarında 106 ile 30 kDa arasında değişik sayılarda antijenik bantlar tespit edildi. Koyun kist sıvısı ile fare kist sıvısı arasındaki ortak antijenik bantların 40 kDa ve 26 kDa, koyun kist membranı ile fare kist membranı arasındaki ortak antijenik bantların 48 kDa ve 40 kDa olduğu belirlendi. Belirlenen antijenik proteinlerden, glikoprotein yapısında olanlar ve bunların hangi şekerleri bulduklarını glikan kitleri ile belirlendi. Koyunlarda her üç kist materyalinde de (kist sıvısı, kist membranı, protoskoleks) 116 kDa, 68kDa, 48 kDa'luk proteinlerin, farelerde her iki kist materyalinde de (kist sıvısı, kist membranı) 106 kDa, 48, 40 kDa'luk proteinlerin ortak glikoproteinler olduğu tespit edildi. Bu glikoproteinlerin mannoz, galaktoz, N-asetil galaktozamin, sialik asit gibi şekerlerden bir ya da bir kaçını içerdikleri belirlendi. Koyun ve farelerin kist materyalleri arasında yapılan karşılaştırmada ortak bantların, molekül büyüklüğü, glikoprotein varlığı ve şeker yapıları yönünden benzerlikler ve farklılıklar gösterdiği görüldü.

Anahtar sözcükler: Antijenik protein, fare, glikoprotein, kist hidatik, koyun.

## Comparative analysis of sheep and mice hydatid cyst proteins and evaluation of the glycoprotein occurrence in the antigenic proteins

**Summary:** The aim of this study is to compare the hydatid cyst proteins of mice and sheep in terms of antigenic proteins and antigenic glycoproteins. For this reason 20 each infected sheep and mice and 10 each healthy sheep and mice were used. Cyst fluid, cyst membrane and proteins from protoscolex which were derived from hydatidosis infected sheeps and experimentally infected mice were separated by SDS-PAGE. Antigenic proteins were determined by immunblotting technique. Molecular weights of antigenic proteins from cyst fluid, cyst membrane and protoscolex of sheep were determined in size between 116 kDa and 26 kDa by SDS-PAGE. Cyst fluid and cyst membrane of mice, molecular weights of antigenic proteins were found between 106 kDa and 30kDa. Common antigenic bands of hydatid fluid from sheep and mice were found to be 40 kDa and 26 kDa. Common antigenic bands of hydatid membrane from sheep and mice found to be 48 kDa and 40 kDa. Sugars of antigenic proteins in glycoprotein structure were determined by glycan kits. Glycan analysis of samples showed that 116 kDa, 68 kDa and 48 kDa proteins in each three cyst material (cyst fluid, cyst membrane and protoscolex) obtained from sheep were found to be common glycoproteins. In addition to this, 106 kDa, 48 kDa and 40 kDa proteins in each two cyst material (cyst fluid, cyst membrane) obtained from mice were also found to be common glycoproteins. It was determined that these glycoproteins include one or more sugar structures such as mannose, galactose, N-acetyl galactosamine and sialic acid. In the context of sheep and mice cyst material comparison, it was determined that common proteins shows similarities and dissimilarities in molecular weight, glycoprotein and sugar structures in general.

Key words: Antigenic protein, cyst hydatid, glycoprotein, mice, sheep.

## Giriş

Hidatik kist Hastalığı (Hidatidozis), hem insanları, hem de hayvanları etkileyen dünyadaki en önemli zoonozlardan biri olup, özellikle az gelişmiş ülkelerde,

bu hastalığa oldukça sık rastlanmaktadır (6,21,28,33). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008-2015 stratejik planı kapsamında oluşturulan İhmal Edilmiş Zoonozlar Grubu, hidatidozis ile mücadele çalışmalarına hız vermiştir

<sup>1</sup> Bu makale Serap ÜNÜBOL AYPAK'a ait doktora tezinden özetlenmiş olup, tez çalışması Ankara Üniversitesi BIYEP ve Adnan Menderes Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir.

\* Bu çalışma için etik kurul onayı alınmıştır.

(7,26). Hastalığın erken tanısı tedavide başarı oranını artırmaktadır (35). Bir kistin varlığını onaylamak için görüntüleme tekniklerinin yanında serolojik tekniklerin kullanımı gerekmektedir. Kist hidatik genetik materyali Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi tekniklerle kolayca saptanabilmekte ise de kullanımı genelde araştırma amaçlı olup kısıtlıdır (1). İmmunblotting tekniğinin insanlarda paraziter hastalıkların tanısında son derece hassas ve spesifik sonuçlar verdiği bildirilmekte (15,27), yapılan çalışmalarda bu testin çapraz reaksiyon riskini önemli oranda azalttığı, erken teşhis için çok önemli bir basamak teşkil ettiği kaydedilmektedir (8,11).

Glikoproteinler polipeptid iskeletlerine kovalent olarak bağlı oligosakkarit (glikan) zincirlerini içeren proteinlerdir (12). Protein glikozilasyonu proteinlerin en yaygın posttranslasyonel modifikasyonudur ve proteinin antijenik özelliklerine katkıda bulunur (37,38). Glikozilasyona uğramış proteinler, farklı tip antijenik epitoplar taşırlar (22,36) ve glikoproteinler immün sistem efektörlerinin anahtar komponentleridirler (28). Hidatik kistin laminar tabakası karbonhidrattan oldukça zengin bir yapıya sahiptir ve bu yapı parazit larvalarını konak saldırısından koruduğu gibi konağa karşı immün yanıt oluşmasına da sebep olur (10). Ayrıca karbonhidrattan zengin bu yapının büyük oranda müsin tip O glikanlardan oluştuğu bildirilmiştir (9). Bunun yanında N-bağlı glikanlar da bulunur. Örneğin kist hidatiğin majör antijenik proteini olan antijen 5, N bağlı bir glikoproteindir (25). Protein ve glikoproteinlerin detaylı analizleri, konak-parazit arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına ve böylece immün cevabın araştırılmasındaki eksik bilgilerin tamamlanmasına yardımcı olacaktır. Bu açıdan bakıldığında koyun ve fare kist materyallerinde glikoprotein analizlerinden elde edilen sonuçların hastalığın teşhisi ve aşı çalışmaları için yararlı bir adım oluşturacağı düşünülmektedir.

Hidatik kistin serolojik tanısında, koyun kökenli kistlerden elde edilen antijenlerin, sığır ve insan kökenlilere göre daha hassas sonuçlar verdiği bildirilmiştir (17). Bu hastalıkla ilgili çalışmalarda daha değerli olan koyun hidatik kist materyalinin her zaman elde edilemiyor olması, deneysel oluşturulduğunda daha fazla zaman, maliyet ve emek gerektiriyor olması alternatif kaynakların sorgulanmasını gerekli kılmıştır. Bu amaçla bakım ve beslenmesi kolay ve pek çok bilimsel çalışmada kullanılabilen farelerden elde edilebilecek kistik materyallerin, koyun kökenli doğal enfekte kist hidatik materyalleri ile uyumluluğu protein profilleri açısından karşılaştırılarak araştırıldı.

Bu çalışmada; doğal enfekte koyunlarda ve deneysel enfekte farelerde hidatik kist materyallerinin (kist sıvısı, membran, protoskoleks) antijenik proteinlerinin belirlenmesi, belirlenen antijenik proteinlerde karbonhidrat varlığının araştırılması, koyun ve fare kökenli hidatik kist materyallerinin antijenik proteinler ve glikoproteinler yönünden karşılaştırılması amaçlandı.

## Materyal ve Metod

### *Koyunlardan örnek toplanması ve antijen hazırlama:*

Çalışma materyali için Ankara'nın Kazan ve Çubuk ilçeleri mezbahalarında, kesimi yapılan koyunların kanları tüplere alındı, daha sonra bu hayvanların kesimleri takip edilerek kist hidatikli olanlar belirlendi. 20 pozitif, 10 negatif hayvandan alınan karaciğer ve kan örnekleri kullanıldı. Ticari olarak birer adet enfekte olmayan koyun ve fare serumları temin edildi. Örnekler en kısa sürede laboratuvara getirilerek kanların serumları ayrıldı ve -80°C'de saklandı. Koyun karaciğerinden toplanan kist hidatik sıvısı 10.000 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek protoskoleksler çöktürüldü. Üstte kalan kist hidatik sıvısı alınarak 0,45 µm'lik membran filtreden geçirildi. Daha sonra solusyon diyaliz torbasına konularak 36 saat distile suya karşı +4°C'de diyaliz edildi. Böylece tuzlarından arındırılarak hazır hale gelen kist hidatik sıvısı antijeni -80°C'de saklandı. Önceki santrifüj işlemi sonunda dipte toplanan protoskoleksler birkaç kez distile su ile yıkandıktan sonra %10 SDS ile 30 dakika çalkalayıcıda bırakılarak parçalandı ve elde edilen sıvı 0,45 µm'lik membran filtreden geçirildi ve solusyon diyaliz torbasına konularak, 36 saat, distile suya karşı, +4°C'de diyaliz edildi. Hazır hale gelen protoskoleks antijeni -80°C'de saklandı.

Kist hidatiklerin sıvıları ve protoskoleksleri yanısıra kist hidatik membranları da karaciğerden dikkatlice ayrıldıktan sonra çok iyi temizlenmiş ve ısıya dayanıklı bir havan içerisine konularak üzerlerine sıvı azot ilave edildi. Sıvı azotun uçmasıyla beraber aşırı derecede donmuş olan parazitler havan tokmağı ile dövülerek toz haline getirildi. Proteaz inhibitörleri ilave edilerek vorteksle iyice karıştırıldı ve ses dalgalı su banyosunda 30 dakika bekletildi. 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 kist membranı antijenleri 0,45 µm'lik membran filtreden geçirilerek -80°C'de saklandı.

*Farelerin deneysel enfeksiyonu:* Farelerin deneysel enfeksiyonu için 15-25 günlük 30 adedi enfekte edilmek, 10 adedi kontrol olmak üzere toplam 40 adet Swiss albino fare kullanıldı. Denemeler için gerekli *Echinococcus granulosus* protoskoleksleri toplanan fertil ekinokok kistlerinden elde edildi. Kist sıvısı, alınan protoskoleksler temizleninceye kadar fizyolojik tuzlu su ile yıkandı. Protoskolekslerin canlılığı; morfolojilerine, hareketliliğine, alev hücrelerinin aktivitelerine ve eozin ile boyanıp (ölü) boyanmamalarına (canlı) göre kontrol edildi. Fizyolojik tuzlu su ile 0,5 ml'de yaklaşık 3000 protoskoleks olacak şekilde protoskoleks süspansiyonu ayarlandıktan sonra üzerine, 1 ml'de, 1000 ünite penisilin, 0,001g streptomisin bulunacak şekilde antibiyotik eklendi. Enfekte edilecek 30 fareye hazırlanan süspansiyondan 0,5 ml, bir enjektörle karın boşluğuna verildi. Kistlerin gelişmesi için 7 ay beklendi ve süre sonunda fareler elden

çıkartılarak serumlar elde edildi ve aynı zamanda antijen hazırlanması amacıyla nekropsileri yapılarak gelişmiş olan sekonder kistler alınıp, kist sıvıları ve kist duvarları toplandı. Elde edilen kist sıvıları, koyunlardan elde edilen primer kist hidatik sıvılarına yapılan işlemler tekrar edilerek -80°C’de saklandı.

*Kist materyallerinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile protein profillerinin belirlenmesi:* Daha önceden kullanıma hazır hale getirilmiş ve -80°C’de bekleyen kist hidatik antijenleri çözdürüldü ve protein miktarları Lowry yöntemi ile ölçüldü (23). Daha sonra koyun ve fare kist hidatik antijenlerine ait protein profillerini belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı (20,39). Elektroforez işleminden sonra jeller Blue Silver (5) boya çözeltisi ile boyandı. SDS-PAGE sonucunda görülen bantların molekül ağırlıkları moleküler imaj yazılımı ile hesaplandı.

*İmmunblotting (Western Blotting) tekniği ile antijenik yapının analizi:* Antijenik yapının belirlenmesi amacıyla Burnie ve ark. (4) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. İmmunblotting sonucunda görülen bantların molekül ağırlıkları moleküler imaj yazılımı ile hesaplandı.

*Glikoprotein varlığının belirlenmesi:* 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 lentinler kullanıldı. Oluşan bantların molekül ağırlıkları moleküler imaj yazılımı ile hesaplandı.

## Bulgular

*Koyunlarda kist hidatik protein profilleri:* SDS-PAGE ile analiz sonucunda koyun kist sıvılarında 214-8 kDa arasında 26 adet, kist membranlarında 219-8 kDa arasında 30 adet, protoskolekslerinde ise 200-8 kDa arasında 33 adet bant bulundu.

*Koyunlarda kist hidatik antijenik proteinleri:* 20 hasta koyun serumu kullanılarak gerçekleştirilen immunblotting sonucunda koyun kist sıvısında ve kist membranında 5’er adet, protoskolekslerinde 4 adet antijenik bant tespit edildi.

*Koyunlarda kist hidatik proteinlerinde glikoprotein profili:* Koyun kist sıvısındaki 116 kDa ve 68 kDa’luk proteinin mannoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdiği, 48 kDa’luk proteinin ise sadece mannoz içerdiği, koyun kist membranındaki 116 kDa ‘luk proteinin galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdiği, 68 kDa’luk proteinin mannoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdiği, 48 kDa’luk proteinin sialik asit ve galaktoz içerdiği, 40 kDa’luk proteinin ise mannoz içerdiği, koyun protoskolekslerinde 116 kDa’luk proteinin mannoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdiği, 48

kDa ve 68 kDa’luk proteinin sadece mannoz içerdiği belirlendi.

*Farelerde kist hidatik protein profilleri:* SDS-PAGE yöntemi ile analiz sonucunda fare kist sıvılarında 225-8 kDa arasında 14 adet , fare kist membranlarında 266 kDa-8 kDa arasında 22 adet bant bulundu.

*Farelerde kist hidatik antijenik proteinleri:* 20 hasta fare serumu kullanılarak gerçekleştirilen immunblotting sonucunda 106 kDa-8 kDa arasında 7 adet, fare kist membranında 5 adet antijenik bant tespit edildi.

*Farelerde kist hidatik proteinlerinde glikoprotein profili:* Fare kist sıvısındaki antijenik proteinlerden 106 kDa ve 40 kDa’luk proteinlerin sialik asit ve galaktoz içerdiği, fare kist membranındaki antijenik proteinlerden 106 kDa’luk proteinin sialik asit ve galaktoz, 48 kDa’luk proteinin sialik asit, galaktoz, N-asetil galaktozamin ve mannoz içerdiği, 40 kDa’luk proteinin sialik asit, galaktoz ve mannoz, 30 kDa’luk proteinin sialik asit ve galaktoz içerdiği belirlendi.

Koyun ve fare kist materyallerinin protein ve glikoprotein analizlerine ait sonuçlar tablo’da gösterilmiştir.

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada hidatik kistle doğal enfekte koyun ve deneysel enfekte farelerden elde edilen kist materyallerinin (kist sıvısı, protoskoleks ve kist membranı) protein profilleri belirlenerek, hangilerinin antijenik olduğu tespit edildi ve bu antijenik proteinlerden glikoprotein yapısında olanlar araştırıldı. Çalışmanın tamamının örneği olmamakla birlikte bazı bölümlerinin yerli ve yabancı araştırmacılar tarafından da yapıldığı anlaşıldı. Özellikle antijenik proteinlerde glikoprotein analizleri Türkiye’de ilk defa bu çalışma ile gerçekleştirildi.

Yaptığımız çalışmada koyun kist materyallerinde benzer antijenik bantlarının birçok araştırmacı tarafından da gösterildiğini görmekteyiz (3, 14, 29, 30, 34). Bu araştırmacıların bazıları bizim kontrol serumlarında göremediğimiz ve antijenik olarak kabul ettiğimiz bazı bantları sistiserkozisli, diğer paraziter enfeksiyonlu, viral hepatitisli hayvanlarla birlikte sağlıklı kontrollerde de bildirmişlerdir (16). Bazı araştırmacılar ise bizim de antijenik olarak tespit edemediğimiz 8 kDa’luk proteini nitroselüloz membranda gösterememelerini küçük olan bu proteinin elektrik akımının etkisiyle membran porlarından geçmiş olabileceğine bağlamışlardır (19).

Koyun kist membranının antijenik proteinleriyle ilgili ulaşılabildiğimiz tek literatürde kist membranından 29 kDa’luk yeni bir proteinin karakterize edildiği görülmüştür (13). Çalışmamızda antikora yanıt veren bantlardan 27 kDa’luk bantın aynı bant olabileceğini düşünmekle birlikte aynı banta kontrol ve enfekte olmamış serumlarda da rastlanmıştır.

Protoskolekslere ilişkin çalışmamızla paralellik arz eden oldukça az sayıda literatür bulunmaktadır. Antijenik

Tablo: Koyun ve fare kist materyallerinin protein ve glikoprotein analizlerine ait sonuçlar.  
Table: Results of the protein and glycoprotein analysis of sheep and mouse cysts materials.

KOYUN						FARE								
Kist sıvısı			Kist membranı			Protoskoleks			Kist sıvısı			Kist membranı		
SDS-PAGE	GP		SDS-PAGE	GP		SDS-PAGE	GP		SDS-PAGE	GP		SDS-PAGE	GP	
	GTK	GAK.		GT.K	GAK		GTK.	GAT		GTK	GAT		GTK	GAT
WB			WB			WB			WB			WB		
214			219			200			225			266		
168			199			167			106	106	106	SNA	106	106
144			175			132			82			96		
116	116	116	148			116	116	116	64	64	64	75		
111			116	116		91			58			64		
98			102			81			52			58		
93			96			75	75		42			48	48	48
														MAA DSA GNA SNA
81			87			68	68	68	40	40	40	SNA	44	
68	68	68	82			62			33			42		
64			75	75		60			26	26		40	40	40
														MAA GNA
60			68	68	68	58			24			38	38	
58			58			54			22	22		35		
48	48	48	54			48			15	15		33		
45			48	48	48	45			8	8		30	30	30
														MAA SNA
44			42			42						28		
40	40	40	40	40	40	40						27		
35			39			38						24		
30			38			37						23		
26	26		36			36						21		
24			30			34						20		
18			28			32						16		
20			27			29						15		
16			23			28								
14			22			26	26							
8			20			24								
			21			22								
			16			21								
			14			20								
			10			17								
			8			15								
						13								
						10								
						8								

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi, WB: Western Blotting, GP: Glikoprotein, GTK: Glikan Tayin Kiti, GA: Glikan Ayırtetme Kiti, MAA: *Maackia amurensis agglutinin*, GNA: *Galanthus nivalis agglutinin*, SNA: *Sambucus nigra agglutinin*, PNA: *Peanut agglutinin*, DSA: *Datura stramonium agglutinin*.

karakter gösteren, enfekte olmamış ve kontrol serumlarla bant vermeyen proteinler, yapılan çalışmalarda bulunan proteinlerle karşılaştırıldığında antijenik bulduğumuz 68 kDa'luk bantın, Doğanay ve ark. (11) tarafından antijenik ve spesifik bulunduğu görülmektedir. Bu araştırmacılar; koyunlar için kist hidatik spesifik protein bantlarının 68 kDa, 24 kDa ve 8 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda Shibi ve ark. (30)'nın bulduğu 66 kDa'luk antijenik bantın da aynı bant olabileceği düşünülmektedir. Yine bulduğumuz 26 kDa'luk bantın Doğanay ve ark. (11)'nin antijenik ve spesifik olarak bulduğu 24 kDa'luk bantla aynı bant olabileceğini düşünülmektedir.

Spesifitede görülen farklılıkların antijen hazırlama şekline ve popülasyonlardaki çevresel faktörlere bağlı olabileceği bildirilmiştir (31,32). Benzer çalışmalarda gözlenen değişik sonuçların; değişen teknikler, ölçme ve değerlendirme metodlarındaki gelişmeler ve kullanılan hidatik kist materyallerinin fertil olup olmadığı, yaşı, yetiştirme bölgesi ve buna bağlı muhtemel parazit alt türleri düzeyindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kist hidatik proteinlerinde glikoprotein varlığına ilişkin çalışmalar oldukça sınırlı sayıda olup, bizim çalışmamızla bire bir paralellik arzeden bir literatüre rastlanamamıştır. Çalışmamızda kullandığımız koyun kist materyalleri, içerdikleri şekerler yönünden büyük oranda benzerlik arz etse de çok küçük farklılıklara da rastlanmıştır (koyun kist membranında bulunan sialik asit gibi).

Al-Yaman ve Knobloch (2)'un koyun kist sıvısında Eg 48 olarak tanımladıkları glikoprotein yapısındaki antijenin, kist sıvısı ve kist membranında gösterdiğimiz 48 kDa'luk bantla aynı olabileceğini düşünmekteyiz. Khoo ve ark. (18)'nin kist membranında bildirdiği yüksek mannoz yapıları 40 kDa ve 68 kDa'luk proteinlerin *Galanthus nivalis agglutinin* (GNA) lektiniyle bağlandığını göstererek, sialik asit içeren N-glikanları da 48 kDa'luk proteinin *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) lektiniyle bağlandığını göstererek doğruladık. Protoskolekslerde ise SNA ve *Maackia amurensis agglutinin* (MAA) lektinleriyle bağlanma görememiz, bu araştırmacıların protoskoleks ekstraktında sialik asit içeren N-glikanları gözleyememelerini destekler niteliktedir.

Deneysel olarak enfekte ettiğimiz farelerde öngörülen süre içerisinde gelişen hidatik kistlerde protoskoleks gelişimi olmamıştır. Fare kist materyallerinin antijenik proteinlerinin araştırılmasına ilişkin bulabildiğimiz tek literatürde fare hidatik kist sıvısında 8 kDa'luk spesifik bir protein bulmuşlar ve purifiye etmişlerdir. Maddison ve ark. (24) fare kist sıvısı ve fare kist membranında tespit ettikleri proteinlerden 106 kDa ve 40 kDa olanların ortak olduğunu ifade etmişlerdir. 106 kDa'luk glikoprotein bandı kist sıvısı ve kist membranında aynı lektinle bağlanma göstermiş, 40 kDa'luk glikoprotein bandı ise

kist sıvısında ve kist membranında farklı lektinlerle bağlanmışlardır.

Koyunlarda olduğu gibi farelerde de kist hidatik materyallerinin şeker içerikleri, kendi içinde karşılaştırıldığında büyük oranda benzerlik gösterse de küçük farklılıklara da rastlanmıştır. Koyun kist hidatik materyalleri ile fare kist hidatik materyalleri şeker içerikleri yönünden karşılaştırıldığında önemli farklılıklar göze çarpmaktadır. Kist materyalleri aynı şekerleri içeriyor olsa da bağlandıkları lektinlerin farklı olması nedeniyle bağlanma bölgeleri açısından da farklılıklar göstermektedir.

Sonuç olarak, doğal enfekte koyunlarla deneysel enfekte fareler arasında ortak antijenik proteinler bulunmamız, ileri düzeydeki moleküler çalışmalarda farelerin koyunlar yerine kullanılabilirliği açısından ümit verici olsa da, antijenik proteinler ve glikoproteinler arasında gözlenen farklılıklar, çalışmalarda fareleri koyunlar yerine güvenle kullanamayacağımıza işaret etmektedir. Yakın gelecekte ileri düzeydeki moleküler tekniklerle yapılacak olan çalışmalarla antijenik yapıdaki glikoproteinlerin yapısal ve fonksiyonel yönden daha ileri düzeyde analizlerine ihtiyaç bulunmaktadır.

### Kaynaklar

1. **Akyol ÇV** (2001): *Hidatidoz ve halk sağlığı yönünden önemi*. J. Fac. Vet. Med., **20**, 137-142.
2. **Al-Yaman FM, Knobloch J.** (1989): *Isolation and partial characterisation of species specific and cross reactive antigens of Echinococcus granulosus cyst fluid*. Mol. Biochem. Parasitol, **37**, 101-108.
3. **Burgu A, Doganay A, Gonenc B, Sarimehmetoglu HO, Kalinbacak F** (2000): *Analysis of fluids of hydatid cyst from sheep by SDS-PAGE and determination of specific antigens in protein structure by western blotting*. Türk. J. Vet. Anim. Sci, **24**, 493-500.
4. **Burnie JP, Holland M, Matthews RC, Lees W** (1987): *Role immunoblotting in the diagnosis of culture negative and enterococcal endocarditis*. J. Clin. Pathol, **40**, 1149-1158.
5. **Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri, GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG** (2004): *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. Electrophoresis, **25**, 1327-1333.
6. **Carmena D, Sánchez-Serrano LP, Barbero-Martínez I** (2008): *Echinococcus granulosus infection in Spain*. Zoonoses Public Health, **55**, 156-165.
7. **Craig PS, Budke CM, Schantz PM** (2007): *Human echinococcosis: A neglected disease? Tropical Medicine and Health*. **35**, 283-292.
8. **Craig PS, Mcmanus DP, Lightowers MW, Chabalgoity JA, Garcia HH, Gavidia CM, Gilman RH, Gonzalez AE, Lorca M, Naquira C, Nieto A, Shantz PM** (2007): *Prevention and control of cystic echinococcosis*. Lancet Infect Dis, **7**, 385-94.
9. **Díaz A, Fontana EC, Todeschini AR, Soulé S, González H, Casaravilla C, Portela M, Mohana-Borges**

- R, Mendonça-Previato L, Previato JO, Ferreira F** (2009): *The major surface carbohydrates of the Echinococcus granulosus cyst: mucin-type O-glycans decorated by novel galactose-based structures.* Biochemistry, **48**, 11678-11691.
10. **Díaz A, Casaravilla C, Allen JE, Sim RB, Ferreira AM** (2011): *Understanding the laminated layer of larval Echinococcus II: immunology.* Trends Parasitol, **7**, 264-73.
11. **Doganay A, Burgu A, Gonenç B, Sarimehmetoglu HO** (2000): *Koyun kist hidatik protoskolekslerinin protein yapısının analizi ve spesifik antijenlerin saptanması.* Ankara. Vet. Fak. Derg, **47**, 63-71.
12. **Ghorui SK, Prasad RL, Pal AK, Sahai BN** (1990): *Proteins and glycoproteins distribution in cyst wall and germinal layer of hydatid cyst.* Indian Vet. J, **67**, 802-804.
13. **Gonzalez G, Spinelli P, Lorenzo C, Hellman U, Nieto A, Willis A, Salinas G** (2000): *Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of Echinococcus granulosus which is immunologically related to, but distinct from, antigen 5.* Mol Biochem Parasitol, **105**, 177-184.
14. **Irabuena O, Nieto, Ferreira AM, Battistoni J, Ferragut G.** (2000): *Characterization and optimization of Bovine Echinococcus granulosus cyst fluid to be used in immunodiagnosis of hydatid disease by ELISA.* Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, **42**, 255-262.
15. **Kanvar JR, Kaushik SP, Sawhney M.S, Kambo MS, Mehta S, Vinayak VK.** (1992): *Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting.* J.Med.Microbiol, **16**, 46-51.
16. **Kanvar JR, Vinayak VK.** (1993): *Isolation & immunochemical characterization of diagnostically relevant antigens of Echinococcus granulosus.* Indian J. Med. Res, **97**, 75-82.
17. **Karaman U, Atambay M, Aycan OM, Daldal N** (2002): *İndirekt hemaglutinasyon tekniğinde (IHA) insan, inek ve koyun antijenlerinin karşılaştırılması.* T. Parazitol. Derg, **26**, 251-253.
18. **Khoo KK, Nieto A, Morris HR, Dell A.** (1997): *Structural characterisation of the N-glycans from Echinococcus granulosus hydatid cyst membrane and protoscoleces.* Mol. Biochem. Parasitol, **86**, 237-248.
19. **Köksal F, Serin MS, Kekeç Y, Sadri YE** (1995): *İnsan ve hayvan kökenli kist hidatik sıvılarının SDS-PAGE metoduyla analizi ve western blot metodunun klinik önemi.* T. Parazitol. Derg, **19**, 221-229.
20. **Laemmli K.** (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, **227**, 680-685.
21. **Leggatt GR, Yong W, Mcmanus DP.** (1992): *Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in E. granulosus cyst fluid by immunoblot analysis.* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, **86**, 189-92.
22. **Lisowska E.** (2002). *The role of glycosylation in protein antigenic properties.* Cell. Mol. Life Sci, **59**, 445-455.
23. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, And Randall RJ** (1951): *Protein measurement with the folin phenol reagent.* J. Biol. Chem, **193**, 265-275.
24. **Maddison SE, Slemenda SB, Schwantz PM, Fried JA, Wilson M, Tsang VCW.** (1989): *A Specific diagnostic antigen of Echinococcus Granulosus with an apparent molecular weight of 8 kda.* Am. J. Trop. Hyg, **40**, 377-383.
25. **March F, Enrich C, Mercader M, Sánchez F, Muñoz C, Coll P, Prats G** (1991): *Echinococcus granulosus: antigen characterization by chemical treatment and enzymatic deglycosylation.* Exp. Parasitol, **73**, 433-439.
26. **Menezes da Silva A** (2010): *Human echinococcosis: a neglected disease.* Gastroenterology Research and Practice., doi: 10.1155/2010/583297.
27. **Richard MD, Ligtowers MW** (1986). *Immunodiagnosis of hydatid disease.* In thompson RCA (Editor). The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease. George Allen and Unwin, London: 217-249.
28. **Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA** (2001): *Glycosylation and the Immune system.* Science, **291**, 2370-2376.
29. **Sarimehmetoglu OH, Kubar A, Tanyuksel M, Gun H.** (1998): *Koyun karaciğer kist sıvısından 8 kDa'luk antijenin purifikasyonu.* T Parazitol Derg, **22**, 137-141.
30. **Sbihi Y, Jansen D, Osuna A** (1996): *Serologic Recognition of Hydatid cyst antigens using different purification methods.* Diagn. Microbiol. Infect. Dis, **24**, 205-211.
31. **Shepherd JC, Mcmanus, DP** (1987): *Specific and cross-reactive antigens of Echinococcus granulosus Hydatid cyst fluid.* Mol. Biochem Parasitol, **25**, 143-154.
32. **Siracusano A, İoppolo S, Notargiacomo S, Ortona E, Teggi A, De Rose F, Vicari G.** (1991): *Detection of antibodies against E. granulosus major antigens and their subunits by immunoblotting.* Trans. of Royal. Soc. Trop. Med. Hyg, **85**, 239-243.
33. **Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E** (2012): *Host-Parasite Relationship in Cystic Echinococcosis: An Evolving Story.* Clin. Dev. Immunol. doi:10.1155/2012/639362.
34. **Sasmaz E, Hashemipoor GR, Bahar İH, Yulug N.** (1995): *Comparative antigenic analysis in Echinococcus granulosus.* T. Parasitol Derg, **19**, 83-87.
35. **Simşek S, Ütük AE, Babur C, Koroglu E.** (2004): *Ekinokok Antijenleri.* Akciğer arşivi, **5**, 158-161.
36. **Walsh G, Jefferis R.** (2006): *Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins.* Nat. Biotechnol, **24**, 1241-1252.
37. **Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Har, G, Marth J** (1999): *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
38. **Zhang XL** (2006): *Roles of glycans and glycopeptides in immune system and immune-related diseases.* Curr Med Chem, **13**, 1141-7.
39. **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: 21.08.2013 / Kabul tarihi: 03.02.2014

**Yazışma adresi:**

Serap Üñübol Aypak  
ADÜ Veteriner Fakültesi  
Biyokimya AD  
Işıklı-AYDIN  
e-posta: serapunubol@yahoo.com