

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOYUN VE FARELERDE KİST HİDATİK PROTEİNLERİNİN  
KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ VE ANTİJENİK  
PROTEİNLERDE GLİKOPROTEİN VARLIĞININ  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Serap ÜNÜBOL AYPAK**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Hamdi UYSAL**

**2007- ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Biyokimya Doktora Programı**

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

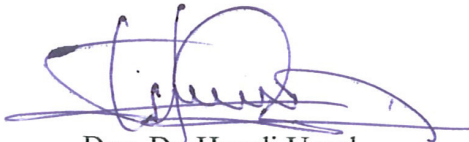
**Doktora Tezi**

olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01.08.2007



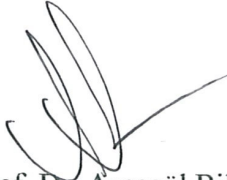
Prof. Dr. Hital Karagül  
Ankara Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı



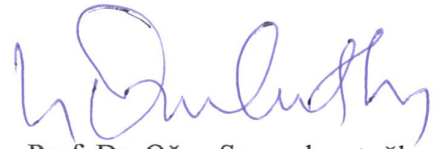
Doç. Dr. Hamdi Uysal  
Ankara Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı  
Raportör (Danışman)



Prof. Dr. Arif Altıntaş  
Ankara Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof. Dr. Ayşegül Bildik  
Adnan Menderes Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof. Dr. Oğuz Sarımehtemoğlu  
Ankara Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Parazitoloji Anabilim Dalı

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
Resimler	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Hidatik Kist Hastalığı (Hidatidozis)	1
1.1.1. Tanım	1
1.1.2. Hidatik Kist Hastalığına Neden Olan Türler	1
1.1.3. E. granulosus granulosus	2
1.1.3.1. Morfoloji	2
1.1.3.2. Yumurta özellikleri	3
1.1.3.3. Konakları	3
1.1.3.4. Yaşam Döngüsü	5
1.1.3.5. Kist Hidatiğin Morfolojisi	7
1.1.3.6. Kist Elemanlarının Antijenik Özelliği	9
1.1.3.7. Ekinokok Antijenleri	10
1.1.4. Hastalığın Tanısı	12
1.1.4.1. Görüntüleme Yöntemleri	13
1.1.4.2. Serolojik Yöntemler	13
1.1.5. Sağaltım	14
1.1.5.1. Son konaklarda sağaltım	14
1.1.5.2. Arakonaklarda sağaltım	16
1.1.6. Koruma ve Kontrol	18
1.2. Glikoproteinler	20
1.2.1. Tanım	20
1.2.2. Glikoproteinlerin Yapısı	20
1.2.2.1. Glikoproteinlerin Yapısında Bulunan Şekerler	21
1.2.2.2. Glikoproteinlerin Yapısında Bulunan Aminoasitler	23
1.2.3. Glikoproteinlerin Sınıflandırılması	24
1.2.3.1. İçerdikleri Bağ Tipine Göre Glikoproteinlerin Sınıflandırılması	24
1.2.3.2. Buldukları Yere Göre Glikoproteinlerin Sınıflandırılması	27
1.2.4.1. Glikoproteinlerin Oligosakkarit Zincirlerinin Fonksiyonları	28
1.2.5. Glikoproteinler ve Parazitizm	28
1.2.6. Glikoproteinlerin Antijenik Özellikleri	29
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>31</b>
2.1. Koyunlardan Örnek Toplanması ve Antijen Hazırlama	31
2.2. Farelerin Deneysel Enfeksiyonu	32
2.3. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	33
2.4. Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	34
2.4.1. SDS-PAGE'de Kullanılan Çözeltiler	35

2.5. Koyun ve Farelere Ait Kist Sıvısı, Kist Membranı ve Protoskoleks Antijenlerinin Protein Profillerinin Belirlenmesi	37
2.6. Western Blotting	38
2.6.1. Western Blottingde Kullanılan Çözeltiler	39
2.7. Western Blotting (İmmunblotting) Tekniği ile Antijenik Yapının Analizi	40
2.8. Glikan Tayin Kiti İle Glikoprotein Varlığının Belirlenmesi	41
2.8.1. Glikan Tayin Kitinin Kullanımı İçin Gerekli Çözeltiler	41
2.8.2. Glikan Tayin Kitinin Kullanımı	42
2.9. Glikan Ayırteci (Diferensiasyon) Kiti ile Glikoproteinlerin Ayrımı	42
2.9.1. Glikan Ayırteci (Diferensiasyon) Kitin Kullanımı İçin Gerekli Çözeltiler	43
2.9.2. Glikan Ayırteci (Diferensiasyon) Kitin Kullanımı	43
<b>3. BULGULAR</b>	45
3.1. Koyunlarda Kist Hidatik Protein Profillerinin, Antijenik Proteinlerinin ve Glikoproteinlerinin Belirlenmesi	45
3.1.1. Koyunlarda Kist Hidatik Protein Profillerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Belirlenmesi	45
3.1.1.1. Koyunlara Ait Kist Sıvısı Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi	45
3.1.1.2. Koyunlara Ait Kist Membranı Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi	46
3.1.1.3. Koyunlara Ait Kist Protoskoleks Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi	47
3.1.2. Koyunlarda Kist Hidatik Antijenik Proteinlerinin İmmunblotting ile Belirlenmesi	48
3.1.2.1. Koyun Kist Sıvısındaki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi	48
3.1.2.2. Koyun Kist Membranındaki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi	50
3.1.2.1. Koyun Protoskolekslerindeki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi	52
3.1.3. Koyunlarda Kist Hidatik Proteinlerinde Glikoprotein Analizi	54
3.1.3.1. Koyunlarda Kist Sıvısı Proteinlerinde Glikoprotein Analizi	54
3.1.3.2. Koyunlarda Kist Membranı Proteinlerinde Glikoprotein Analizi	57
3.1.3.3. Koyunlarda Protoskoleks Antijenik Proteinlerinde Glikoprotein Analizi	58
3.2. Farelerde Deneysel Olarak Geliştirilen Kist Hidatik'te Protein Profillerinin, Antijenik Proteinlerinin ve Glikoproteinlerinin Belirlenmesi	60
3.2.1. Farelerde Kist Hidatik Protein Profillerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Belirlenmesi	61
3.2.1.1. Farelere Ait Kist Sıvısı Antijenlerinin Protein Profillerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Belirlenmesi	61
3.2.1.2. Farelere Ait Kist Membranı Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi	62
3.2.2. Farelerde Kist Hidatik Antijenik Proteinlerinin İmmunblotting ile Belirlenmesi	63
3.2.2.1. Fare Kist Sıvısındaki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi	64
3.2.2.2. Fare Kist Membranındaki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi	64

3.2.3. Farelerde Kist Hidatik Proteinlerinde Glikoprotein Analizi	66
3.2.3.1 Farelerde Kist Sıvısı Proteinlerinde Glikoprotein Analizi	66
3.2.3.2. Farelerde Kist Membranı Proteinlerinde Glikoprotein Analizi	68
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>72</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>82</b>
<b>ÖZET</b>	<b>83</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>84</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>85</b>
<b>EKLER</b>	<b>92</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>93</b>

## ÖNSÖZ

Hidatik kist hastalığı (Hidatidosis), özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde görülen zoonotik bir hastalık olup insan ve çeşitli omnivor ve herbivor hayvanların değişik organlarında görülen içi su dolu keselerle (hidatik kist) karakterizedir.

Ülkemizde kist hidatik antijenik proteinlerine yönelik çalışmalar olmakla beraber, glikobiyoloji konusunda yapılmış bir çalışmaya rastlanamamıştır. Parazitin konak spesifitesi ve immunitesinde son derece önemli olan antijenik glikoproteinlerin analiz edilmesinin konak-parazit arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına ve immun cevabın araştırılmasına yardımcı olarak, gelecekteki aşı çalışmalarına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, doğal enfekte koyun 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 açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen başta Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekan Yardımcısı ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hilal KARAGÜL'e, özellikle özverili destek ve yardımlarından dolayı danışmanım Sayın Doç. Dr. Hamdi UYSAL'a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ'a, Sayın Prof. Dr. Ulvi Reha FİDANCI'ya, Sayın Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Tevhide SEL'e, Adnan Menderes Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK'e, Sayın Doç. Dr. Kamil SEYREK'e, Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe BURGU'ya ve Sayın Prof. Dr. Oğuz SARİMEHMETOĞLU'na, çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı, Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör. Dr. Mert PEKCAN'a, Araş. Gör. Dr. Gülay ÇİFTÇİ'ye, Araş. Gör. Neslihan TAŞÇENE'ye, Araş. Gör. Görkem KISMALI'ya, Helminoloji Bilim Dalı Araş. Gör. Dr. Hamza AVCI'ya, Araş. Gör. Cenk BÖLÜKBAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez projemi destekleyen Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü BİYEP'e ve Adnan Menderes Üniversitesi BAP Müdürlüğüne teşekkür ederim.

Ayrıca sonsuz özveriyle bana yardım eden sevgili eşim Araş. Gör. Dr. Süleyman AYPAK'a ve sevgili kardeşim Kamil ÜNÜBOL'a ve aileme şükranlarımı sunarım.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

m <sup>2</sup>	metre kare
°C	santigrat derece
cm	santimetre
g	gram
mg	miligram
kDa	kilodalton
kg	kilogram
µm	mikrometre
µl	mikrolitre
ml	mililitre
ABD \$	Amerikan doları
Ara	Arabinoz
AE	<b>Alveolar Echinococcosis</b>
APS	<b>Amonyum persülfat</b>
Asn	Asparajin
BT	<b>Bilgisayarlı Tomografi</b>
CE	<b>Cystic Echinococcosis</b>
DSA	Datura stramonium agglutinin
<i>E.granulosus</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
<i>E.g. granulosus</i>	<i>Echinococcus granulosus granulosus</i>
<i>E. multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
<i>E. vogeli</i>	<i>Echinococcus vogeli</i>
Fuc	Fukoz
Gal	Galaktoz
Gal-NAc	N-asetil galaktozamin
Glc	Glikoz
Glc-Nac	N-asetil glikozamin
GNA	<b>Galanthus nivalis agglutinin</b>
Hyl	Hidroksilizin
Hyp	Hidroksiprolin
IFAT	İndirekt <b>Fluoresan Antikor Testi</b>
IHAT	İndirekt <b>Hemaglutinasyon Testi</b>
M	Marker
Man	Mannoz
MAA	<b>Maackia amurensis agglutinin</b>
MR	<b>Manyetik Resonans</b>
NANA	N-asetil nöraminik asit
PBS	<b>Fosfat Buffer saline</b>
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PNA	<b>Peanut agglutinin</b>
SDS	<b>Sodyum Dodesil Sülfat</b>
Ser	Serin
SNA	<b>Sambucus nigra agglutinin</b>
TBS	<b>Tris Buffer Saline</b>

**TEMED**  
**Thr**  
**USG**  
**Xyl**

N,N,N,N-tetrametiletilen-diamin  
Treonin  
Ultrasonografi  
Ksiloz

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b> Kist hidatiğin morfolojisi	8
<b>Şekil 1.2.</b> Glikoproteinlerde en yaygın bulunan şekerler	22
<b>Şekil 1.3.</b> Bir N bağı glikoprotein (N asetil glikozaminin asparajine bağlanması)	24
<b>Şekil 1.4.</b> Karma tip glikoprotein	25
<b>Şekil 1.5.</b> Mannozdan zengin oligosakkarit	26
<b>Şekil 1.6.</b> Melez oligosakkarit	26
<b>Şekil 1.7.</b> Bir O bağı glikoprotein (N asetil galaktozaminin serine bağlanması)	27
<b>Şekil 3.1.</b> Koyun kist sıvısı proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları.	46
<b>Şekil 3.2.</b> Koyun kist membranı proteinlerinin SDS-PAGE ile ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları	47
<b>Şekil 3.3.</b> Koyunlara ait protoskoleks proteinlerinin SDS-PAGE ile ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları	48
<b>Şekil 3.4.</b> Koyun kist sıvısında İmmunblotting ile pozitif koyun serumları kullanılarak elde edilen antijenik protein bantları	49
<b>Şekil 3.5.</b> Koyun kist sıvısında immunblotting ile negatif koyun serumlarında görülen spesifik olmayan bantlar.	50
<b>Şekil 3.6.</b> Koyun kist membranında immunblotting ile pozitif koyun serumları kullanılarak elde edilen protein bantları.	51
<b>Şekil 3.7.</b> Koyun kist membranında immunblotting ile negatif koyun serumlarında görülen spesifik olmayan bantlar.	52
<b>Şekil 3.8.</b> Koyun protoskolekslerinde immunblotting ile pozitif koyun serumları kullanılarak elde edilen antijenik protein bantları.	53
<b>Şekil 3.9.</b> Koyun protoskolekslerinde immunblotting ile negatif koyun serumlarında görülen spesifik olmayan bantlar.	54
<b>Şekil 3.10.</b> Koyun kist sıvısında glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	55
<b>Şekil 3.11.</b> Koyun kist sıvısında glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	56
<b>Şekil 3.12.</b> Koyun kist membranında glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	57
<b>Şekil 3.13.</b> Koyun kist membranında glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	58
<b>Şekil 3.14.</b> Koyun protoskoleksinde glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	59
<b>Şekil 3.15.</b> Koyun protoskolekslerinde glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	60
<b>Şekil 3.16.</b> Fare kist sıvısı antijenlerindeki proteinlerin SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları.	61
<b>Şekil 3.17.</b> Fare kist membranı proteinlerinin SDS-PAGE ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları.	62

<b>Şekil 3.18.</b> Fare kist sıvısının İmmunblotting ile analizinde pozitif fare Serumları kullanılarak elde edilen antijenik protein bantları	63
<b>Şekil 3.19.</b> Fare kist sıvısında immunblotting ile negatif fare serumları kullanılarak elde edilen spesifik olmayan bantlar.	64
<b>Şekil 3.20.</b> Fare kist membranında İmmunblotting ile pozitif fare serumları kullanılarak elde edilen antijenik protein bantları	65
<b>Şekil 3.21.</b> Fare kist membranında immunblotting ile negatif fare serumları kullanılarak elde edilen antijenik protein bantları	66
<b>Şekil 3.22.</b> Koyun kist sıvısında glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	67
<b>Şekil 3.23.</b> Fare kist sıvısında glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	68
<b>Şekil 3.24.</b> Fare kist mebranında glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	69
<b>Şekil 3.25.</b> Fare kist mebranında glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	70

**ÇİZELGELER**

<b>Çizelge 3.1</b>	Çalışmada elde edilen koyun kist sıvısı, koyun kist membranı, koyun protoskoleksleri, fare kist sıvısı ve fare kist mebranı protein analizlerine ait toplu sonuçlar	71
--------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## RESİMLER

**Resim 2.1.** Deneysel olarak enfekte edilen farelerde otopsi sonucu elde edilen kistler.

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Hidatik Kist Hastalığı (Hidatidozis)

### 1.1.1. Tanım:

Hidatik kist hastalığı, çok uzun zamandır bilinen, insan ve hayvan sağlığına verdiği önemli zararların yanı sıra sebep olduğu ekonomik kayıplar nedeniyle de güncelliğini ve önemini koruyan paraziter bir hastalıktır. Yurdumuzda 1861 yılından beri bilinmesine rağmen hastalığın korunma ve kontrolü ile ilgili bir devlet politikası olmaması nedeniyle büyük bir halk sağlığı sorunu olmayı sürdürmektedir (Altıntaş ve ark., 2004).

### 1.1.2. Hidatik Kist Hastalığına Neden Olan Türler:

Hastalığa *Echinococcus* cinsine bağlı türler neden olmaktadır. *Echinococcus* cinsine bağlı en az 15 tür bildirilmesine karşın bunların çoğunun birbirinin sinonimi olduğu anlaşılmış ve *Echinococcus* cinsine bağlı 4 farklı türün olduğu kabul edilmiştir (Dunn, 1978; Tiğın ve ark., 1991).

1. *Echinococcus granulosus*
2. *Echinococcus multilocularis*
3. *Echinococcus oligarthrus*
4. *Echinococcus vogeli*

*Echinococcus granulosus* ilk bildirilen ve en yaygın ekinokok türüdür. İlk kez 1695 yılında Hartmann tarafından köpeklerde görülmüştür. Larvası olan hidatik kist ise Hipokrat' dan itibaren bilinmektedir (Tiğın ve ark., 1991).

Türkiyede cystic echinococcosis (CE)'e neden olan *E.granulosus* ve alveolar echinococcosis (AE)'e neden olan *E. multilocularis* olmak üzere iki formu vardır. Çalışmamız koyun karaciğerlerinden elde edilen hidatik kistler üzerine oluşturulduğu için bundan sonra verilecek bilgiler sadece *Echinococcus granulosus granulosus* alt türü ile ilgili olacaktır.

### **1.1.3. *E. granulosus granulosus***

#### **1.1.3.1. Morfoloji**

Olgun parazitler 2-7 mm uzunluğunda olup, genellikle 3 halkadan oluşmuştur. Son halka gebe, ondan bir önceki halka da olgun halkadır. Gebe halkanın uzunluğu (1.02-3.2 mm) genellikle sestodun tüm uzunluğunun yarısından daha fazladır. Uterus çok iyi gelişmiş olup, yanlara değişik sayıda kısa, kör dallar verir. Uterusda yaklaşık 200-800 yumurta bulunur. Genital delik halkanın daha çok arka yarısında, seyrek olarak da ortasına yakın yer alır. Olgun halkanın boyu eninin iki katı kadardır. Genital organlar gelişmiş durumdadır. Dişi dölerme organları halkanın arka üçte birinde bulunur. Böbrek biçiminde olan ovaryum halkanın ortasında yer alır. Sayıları genellikle 40-60 arasında değişen testisler genital deliğin ön ve arka kısmında (daha çok önde) bulunurlar. Genital delik, gebe halkadaki gibi tek taraflı olup, halkanın arka yarısında yada ortasına yakın bir yerde dışarı açılır. Başta iki sıra halinde dizilmiş 30-60 adet çengel bulunur. Ön sıradaki büyük çengeller 32-42 mikron, arka sıradaki küçük çengeller de 20-36 mikron uzunluğundadır. Başta 4 tane çekmen vardır (Dunn, 1978; Güralp, 1981; Lapage,1968; Thomas, 1974; Tiğın ve ark., 1991; Yamaguti, 1959).

### 1.1.3.2. Yumurta Özellikleri:

Ekinokok yumurtaları yuvarlak veya ovaldir. Tür düzeyinde birbirlerinden kesin olarak ayırt edilemezler. Diğer tenya yumurtalarına benzerler ve büyüklükleri yaklaşık 32-36 µm x 25-30 µm'dir. Embriyofor embriyoyu dış koşullardan koruyan en önemli tabakadır. Embriyofor, keratin benzeri bir proteinden oluşmuş olup geçirgen değildir. Bu yumurtaların taşıdığı onkosferler tenya yumurtalarından çok daha dayanıklıdır. Bunlar toprakta kuruluğa ve dona bir yıl direnç göstermekte, formole ise iki hafta dayanmaktadır (Güralp, 1981; Lapage, 1968; Üner,1991). Yumurtaların 60 derecenin üstündeki ve -70 derecenin altındaki sıcaklıklarda hemen öldüğü bildirilmiştir. Yumurtalar dış çevrede zamanla büzüşmekte ve enfeksiyon yeteneklerini kaybetmektedirler. Arakonaklar da bu yumurtaların alınması sonucu tam bir enfeksiyon olmamaktadır. Hatta önceden herhangi bir ekinokok enfeksiyonu yokken reenfeksiyonlara karşı bağışıklık gibi izlenebilen bazı durumların, enfeksiyon özelliğini kaybetmiş bu yumurtalardan ileri gelebileceği ilgili literatürlere bağlı olarak kaydedilmiştir (Güralp,1981; Tiğın ve ark., 1991).

### 1.1.3.3. Konakları:

Genel olarak, bu türün olgunları karnivorların ince bağırsaklarında, larvaları (hidatik kist) ise insan dahil çeşitli omnivor ve herbivor hayvanların değişik organlarında görülmektedir.

Rausch'a göre *Echinococcus granulosus granulosus* ( *E.g. granulosus*) ilk olarak kurtlar (*Canis lupus Linnaeus*) ile domuz (*Sus scrofa L.*), ren geyiği (*Cervus elaphus L.*) ve yaban öküzü (*Bos primigenus, Bojanus*) gibi yabani toynaklılar arasında bir biyolojik gelişme göstermiştir. Daha sonra

kesin konak olarak köpekler kurdun, evcil ruminantlar da yabani ruminantların yerini almıştır. Böylece sestod, hem yabani (silvatik) hem de evcil (pastoral) konak gruplarına adapte olarak geniş bir coğrafik alana yayılmıştır *E.g. granulosus*' un olgunları larval döneme göre çok sınırlı bir konak grubunda görülmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda bu parazitin larvalarının en az 7 takım memelide gelişebildiği saptanmıştır (Tiğın ve ark. 1991). Buna karşın olgun parazitler, başta evcil köpekler (*Canis familiaris* L.) olmak üzere dingo (*Canis familiaris dingo* Blumenbach) kurt (*C.lupus* L.), çakal (*C.aureus* L.) ve Coyote (*C.latrans* Say), gibi çeşitli karnivorlarda görülmektedir (Dunn, 1978; Güralp,1981; Tiğın ve ark. 1991). Tilkilerin *E.g. granulosus* için kesin konak olarak uygunluğu, tilki türlerine ve diğer faktörlere göre değişiklik göstermektedir. Bazı tilki türleri (*Vulpes* sp., *Uroeyon* sp.) ile yapılan deneysel çalışmalarda halka gelişimi ve büyüklüğünde duraksama olduğu ve halkaların tüm olarak olgunlaşmadığı bildirilmiştir. Buna karşın kimi araştırmacılar, bazı tilki türlerinin (*V.corsac*, *V.vulpes*, *V.bengalensis*) normal şekilde *E.g. granulosus* ile enfekte olabildiğini ve olgun halkaların gelişebildiğini bildirmişlerdir (Tiğın ve ark., 1991).

Bu durumun *E.g. granulosus*'ün farklı popülasyonununun değişik tilki türlerine adapte olmasından ileri gelebileceği bildirilmiştir. İngiliz atlarından toplanan kistlerin tilki (*Vulpes vulpes*) ve köpekler için enfektif olduğu ve aynı derecede geliştiği bildirilmiştir. Buna karşın Avusturya'da koyunlardan toplanan kistlerin tilkilerde (*Vulpes vulpes*) tam bir gelişme göstermediği ve halkaların olgunlaşmadığı belirtilmiştir. Güney Amerika'da tilkilerin bu parazite daha duyarlı oldukları kaydedilmiştir (Schantz, 1982; Tiğın ve ark., 1991).

Evcil kedilerde bazen enfeksiyon oluşturduğu, ancak parazitin hiçbir zaman seksüel olgunluğa erişmediği bildirilmiştir (Tiğın ve ark. 1991).

#### 1.1.3.4. Yaşam Döngüsü

*E.g. granulosus*'un olgunları karnivorlarda, larvaları ise çeşitli herbivor ve omnivorlarda görülmektedir. Son konaklar ara konaklardaki kistli organları ya da kistlerin patlaması sonucu protoskolekslerin bulaşmış olduğu organları yiyerek enfeksiyona yakalanırlar (Tiğın ve ark., 1991).

Uygun ara konak tarafından alınan ekinokok yumurtaları ince bağırsakta açılır. Açılma iki evrede olur. 1.Embriyoforu oluşturan keratin blokların parçalanarak onkosfer zarının ortaya çıkması, 2. Onkosferin aktif hale geçerek onkosfer zarını delmesi. Embriyoforun parçalanmasında pepsin ve pankreatin gibi protein eritici enzimler rol oynar. Bu sırada onkosfer aktif değildir. Onkosfer membranının açığa çıkması ile birlikte safra tuzlarının etkisiyle membran geçirgenliğinde değişiklikler oluşur ve onkosfer aktif hale geçer. Omurgalılarıdaki safra tuzları bileşimindeki farklılıklar nedeniyle safra tuzlarının ara konak seçiminde rol oynadıkları sanılmaktadır. Ancak, yumurtaların bağırsak sistemi dışında da açılabilirdikleri gözönüne alınırsa safranin yumurtaların açılması için kesinlikle gerekli olmadığı da bir gerçektir (Üner, 1991).

Aktif onkosfer serbest hale geçtiğinde ritmik hareketlerle ince bağırsak villuslarına tutunur ve 30-120 dakika içinde onkosfer salgılarının da yardımıyla lamina propria'ya ulaşır. Metasestod' un son lokalizasyonunun belirlenmesinde konağın anatomik ve fizyolojik özellikleri, parazitin tür veya suş farklılıklarının rol oynadığı düşünülmektedir (Üner, 1991).

Onkosfer son yerine ulaştığında metasestod oluşumu başlar. In vivo ve In vitro çalışmalarda onkosferlerin çok hızlı bir şekilde değişim gösterdiğini ve 10-14 gün içinde hücre proliferasyonu, onkosfer çengellerinin yok olması, kas atrofisi, vezikülleşme, orta boşluğun oluşması, germinal ve laminar

tabakaların teşekkülü ile metasestod şekline dönüştüğünü ilgili literatürlere bağlı olarak bildirmiştir (Üner, 1991).

Kesin konak tarafından alınan kist içerisindeki protoskoleksler safranin, pH ve konağa bağlı diğer bazı faktörlerin etkisiyle duodenumun ön kısmında evagine olup bağırsak villusları arasına (hatta bazen liberkühn bezlerine) giderek bağırsak mukozasına sıkıca tutunur. Daha sonra halka yapısı oluşmaya başlar. Enfeksiyondan itibaren gebe halka oluşmasına kadar geçen süre yaklaşık olarak 42-59 gündür. Ekinokok türlerinin son konaklarda yerleşmeleri ve yaşamalarının cinsiyet, hormonal siklus, yaş ve bağışıklık gibi çeşitli konak faktörlerinden etkilendiği ilgili literatürlere göre bildirilmektedir (Tiğın ve ark., 1991).

Erişkin *E. granulosus granulosus*' ların yaklaşık 6-10 ay kadar yaşadığı, bu süre sonunda enfeksiyonun kendiliğinden ortadan kalktığı, bazen halkaların 2 yıl ve daha fazla canlı kalabildikleri belirtilmiştir. (Tiğın ve ark., 1991).

Son konaklarda gelişimini tamamlayan Ekinokok türlerinin son (gebe) halkaları koparak dışkı ile dışarı atılmaktadır. Bazen bu halkalar ince bağırsaklarda parçalanmakta ve dışkı ile dışarı yumurtalar çıkmaktadır. Seyrek olarak da dışkı ile dışarı parazitin tamamı atılmaktadır. Bazı yazarlar (Güralp, 1981), *E. granulosus granulosus*' da gebe halkalardan günde sadece bir tane dışarı çıktığını, bazıları (Schantz, 1982) ise gebe halkanın 2 haftada bir koparak dışarı atıldığını bildirmişlerdir. Dışkı ile dışarı çıkan halkalar ritmik kasılma hareketleri ile dışkı kümesinden uzaklaşmaktadırlar. Daha sonra bu halkalar çürüyüp parçalanmakta ve yumurtalar serbest kalmaktadır. Yumurtalar, rüzgar, su ve artropodlarla çevreye kolayca dağılabilmektedir. Tenya yumurtalarının 10 günde 200.000 m<sup>2</sup> lik bir alana yayılabildiğini ilgili yazarlara atfen kaydedilmiştir (Tiğın ve ark., 1991).

Kist Hidatik: *E.g. granulosus* ' un larvaları olgunlarına oranla çok daha büyük olup büyüklükleri genellikle fındıktan portakal iriliğine kadar değişir. Çok nadir de olsa çapının 50 cm'ye ulaştığı ve içlerinde 16 litre kadar kist sıvısı bulunduğu bildirilmiştir. Büyüklük kistin geliştiği organın dokusal özelliğine göre azalmakta veya artmaktadır. İçi sıvı ile dolu bu kese şeklindeki larva bir kütiküla ile çevrilmiştir, bunun altında tomurcuklanma özelliğine sahip doğurucu bir zar bulunur. Kist sıvısı akıcı ve berrak olup protoskoleks dolu küçük kesecikleri ve serbest protoskoleksleri içerebilir. Kistin dışını paranzimli organlarda üç kattan oluşan bir adventisya tabakası sarmıştır (Tınar ve Coşkun, 1991).

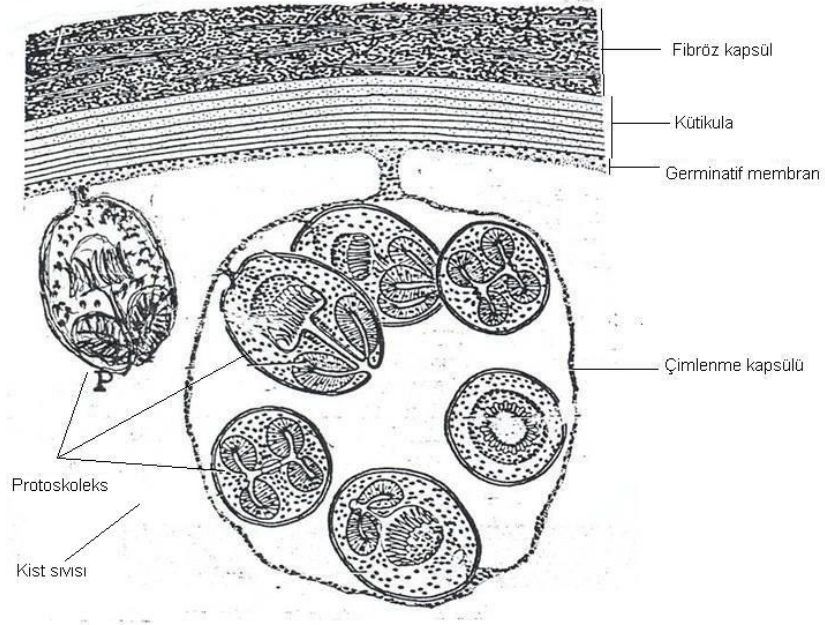
#### 1.1.3.5. Kist Hidatiğin Morfolojisi

Kist membranı iki katmandan şekillenmiştir, içte kist sıvısı bulunur (Şekil 1.1.).

a) Kütiküla: Dış katman kütikula olarak adlandırılır. Kütiküla proteinlere sıkı sıkıya bağlı glikozamin ve polisakkarit yapısında kitinoid tabakalarından şekillenmiştir. Bu yapı nedeniyle, kütiküla suya batırıldığında bir boru gibi kendi eksenine etrafına kıvrılır ki, bu özellik kistin tanımlanmasında kullanılır. Kütikulanın dış katmanı sürekli olarak ayrılıp dökülür ve bu iç membran tarafından sürekli yenilenen kütiküla türlerine göre az çok kalın (300 µm -1 mm), kesintisiz ve iç elementlerle tamamen kuşatılmış, ya da kesintili olabilir. Bu yapı farklılıkları *Echinococcus* cinsinde spesifik faktörleri teşkil eder, bu nedenle değişik türlerde anatomik yapı farklıdır (Tınar ve Coşkun, 1991).

b) Çimlenme zarı (Germinatif membran): Kist cidarının iç katmanı çimlenme zarı, granüler yapıda olup üreme yeteneğine sahiptir. Larvanın bütün elementleri 10-25 milimikron kalınlığındaki sarımsı beyaz veya süt beyazı renginde olan bu zardan oluşur. Germinatif membranın dış

yüzeyinden kütikula, iç yüzeyinden ise çimlenme kapsülleri, protoskoleksler ve kız keseler meydana gelir. Kistin içinde çıplak gözle görülebilen 300-500 µm çapında yüzlerce çimlenme kapsülü ve 100-160 x 140-190 µm boyutlarında çok sayıda protoskoleks bulunabilir. Ekinokok kisti çok sayıda protoskoleks içermesiyle *Cysticercus* ve *Coenurus* larva formlarından ayırt edilir. Germinatif membrandan kopan çimlenme kapsülleri kist boşluğuna düşer, bunların yırtılmasıyla protoskoleksler kist sıvısı içine dağılırlar. Çökerek kist tabanına toplanan protoskoleks ve çimlenme kapsülleri karışımı hidatik kumunu meydana getirir. Bu germinatif elementler belli yaştaki kistlerde oluşur ki bunlara "fertil kist" denir. Germinatif elementlerin görülmediği kistler ise "steril kist" olarak adlandırılır (Dunn, 1978; Güralp, 1981; Tınar ve Coşkun, 1991).



Şekil 1.1. Kist hidatiğin morfolojisi (Altıntaş ve ark., 2004)

Fertilitenin oluşum süresi parazitin genetik yapısına, parazitin ve konağın türüne göre değişir. Bazı kistler hiçbir zaman fertilitite kazanamaz, bazıları ise aşırı fertil olabilirler. Fertilitedeki bu aşırılık kız keselerin şekillenmesine bağlıdır (Tınar ve Coşkun, 1991). Bunlar iki orijindir:

1. Germinatif orijinli olanlar, germinatif membranın bir bölümünden şekillenen kız keselerin ana kesenin dışına doğru gelişmesiyle oluşur. Bu olay daha çok sıgırların *E.granulosus* ile enfeksiyonlarında görülür (Tınar ve Coşkun, 1991).

2. Sefalik orijinliler, ana kesedeki protoskolekslerin keselenmesiyle oluşur ve ana kesesin içinde veya dışında gelişirler. Ana keselerin veya dışta gelişen kız keselerin herhangi bir nedenle yırtılması sonucu serbest kalan protoskolekslerden ya da germinatif membran parçalarından ikincil keseler oluşabilir. Yani protoskoleksler, kesin konaklarda olgun paraziti, ara konaklarda kız keseleri oluştururlar (Tınar ve Coşkun, 1991).

c) Kist sıvısı: Normal kistlerde antijenik ve toksik olan berrak su görünümündedir. Hidatik sıvısı veya halk arasında kaya suyu olarak adlandırılır. Bu sıvı sodyum klorür, glikoz, albumin, amino asit, globulin, glikolitik ve proteolitik enzimler içermektedir. Dağıldığı dokularda nekroza sebep olur. Bu özellik kist yırtıldığında veya kist cidarında bir sızıntı yada anormal bir geçirgenlik olduğunda görülür (Tınar ve Coşkun, 1991).

#### **1.1.3.6. Kist Elemanlarının Antijenik Özelliği**

Tınar ve Coşkun (1991) ilgili literatürlere bağlı olarak laboratuvar şartlarında kist sıvısı verilen tavşanlarda 5 gün içinde antikörlerin oluştuğunu, bunların hidatidozun anafaktik komplikasyonunun nedeni olabildiği gibi hastalığın serolojik teşhisini de mümkün kıldığını kaydetmişlerdir.

Sekonder hidatidoz (ekinokoz): Hayvanda immunitenin olmadığı hallerde primer kistlerden kız keselerin oluşması sonucu meydana gelir. Bu olay akciğer ve karaciğerin yüzeyindeki fertil kistlerin yırtılması sonucu

pleura veya periton boşluğunda veya karaciğer, akciğer gibi organların paranziminde şekillenir (Tınar ve Coşkun, 1991).

### 1.1.3.7. Ekinokok Antijenleri

#### Antijen 5

İlk kez Capron ve arkadaşları tarafından immunelektroforez ile at kist sıvısından izole edilmiştir. Çimlenme zarında, protoskolekslerin paranziminde ve boşaltım sisteminde bulunur (Facon ve ark. 1991, Gökçen, 2002, Karaman ve ark. 2002). Antijen 5 molekül ağırlıkları 37-38 kDa ve 20-24 kDa olan iki alt ünitelerden oluşmaktadır (Di Felice ve ark. 1986, Shepherd ve McManus, 1987, Shibi ve ark.,1996, Poretti ve ark. 1999). Önceleri kistik ekinokokkosis hastalığı için spesifik olduğu düşünülmüş ancak daha sonra *E. multilocularis* ve *E. vogeli* ile enfekte hasta serumlarında da bu antijene karşı antikor geliştiği saptanmıştır (Facon ve ark. 1991).

#### Antijen B

İlk kez Oriol ve ark. (1971) tarafından koyun kist sıvısından izole edilmişlerdir. Isıya dayanıklı bir lipoprotein olan antijen B dış kutikülde, çimlenme kapsülünde ve protoskolekslerin dış örtüsünde bulunur (Maddison ve ark. 1989, Poretti ve ark. 1999, Karaman ve ark. 2002). Molekül ağırlıkları 8-12, 16, 23-24 kDa olan üç alt ünitelerden oluşmaktadır (Di Felice ve ark. 1986, Shepherd ve McManus, 1987, Maddison ve ark. 1989, Poretti ve ark. 1999). Antijen B'nin Antijen 5'e göre immunreaktivitesi daha azdır. Önceleri antijen B'nin de *E.granulosus* için spesifik olduğu sanılmış fakat sonraları *E. multilocularis* ve schistosoma türlerince de sentezlenip salınabildiği anlaşılmıştır (Shibi ve ark. 2001).

### **P-29 Antijeni**

Gonzalez ve ark. (2000) *E. granulosus*'un 29 kDa'luk yeni bir antijenini (P-29) karakterize etmişlerdir. Bu proteinin protoskoleksin tegument ve rostellumunda, kistin üreyici kapsülünde bulunurken kist sıvısı ve erişkin parazit ekstraksiyonunda bulunmadığı bildirilmiştir. Hidatik kist sıvılarında bilinenlerden farklı, alternatif antijen arayışları sırasında karşılaşılan ve izole edilen P-29 antijeninin parazitin metasestod aşamasında sınırlı kaldığı ve tedavide değerli olabileceği bildirilirken söz konusu antijenin Ag5 ile immunolojik olarak ilişkili fakat farklı proteinler olduğu belirtilmiştir.

### **Tn Antijeni**

Errico ve ark. (2001) tarafından *E. granulosus*'un larval ve erişkin ekstraktında bulunan glikoprotein yapısındaki Tn antijeni kanserle ilişkili olup O-glikolizedir. 43 ve 49 kDa'luk başlıca iki komponentten oluşur. Serumda bulunan Tn antijenin hastalığın belirteci olarak düşünülebileceği ve bu durumun potansiyel olarak terapiye cevabı izlemeye ve hidatik hastalardaki nüksü tahmin etmeye yararlı olabileceği bildirilmiştir (Errico ve ark. 2001).

### **Eg 20 ve Eg 48**

Koyun hidatik kist sıvısından Al-Yaman ve Knobloch (1989) tarafından izole edilmişlerdir. Her ikisi de glikoprotein yapısında olup molekül ağırlıkları 20 ve 48 kDa'dur. Eg 20'nin kist hidatik hastalığı için spesifik olduğu düşünülürken Eg 48 *E. multilocularis*'li hasta serumlarıyla çapraz reaksiyon vermektedir (Al-Yaman ve Knobloch,1989).

#### 1.1.4. Hastalığın Tanısı

Ekinokok türleri ile enfekte karnivorlarda hemen hemen hiçbir klinik belirti görülmemektedir. Bu hayvanlarda ekinokokozun teşhisi otopsi yada dışkı bakısı ile yapılabilmektedir (Tiğın ve ark. 1991).

Ekinokok enfeksiyonlarında dışkı ile dışarı genellikle gebe halkalar, seyrek olarak da parazitin tamamı atılmaktadır. Ancak, halkaların küçük olmaları ve az sayıda atılmaları nedeniyle dışkıda görülmeleri çok güç olmaktadır (Güralp, 1981). Bundan dolayı son konaklarda ekinokokozun sağlıklı teşhisi hayvanlara Arecoline hidrobromide (1-2 mg/kg) gibi bir tenyafüj verildikten sonra mümkün olabilmektedir (Tiğın ve ark. 1991).

Her ne kadar dışkıda ekinokok yumurtalarına rastlanabilirse de morfolojik benzerlikleri nedeniyle bu yumurtaları tenya yumurtalarından ayırt etmek olanaksızdır (Tiğın ve ark.1991).

Dışkıda halkaların görülebilmesi için, dışkının önce makroskopik olarak dikkatli bir şekilde gözden geçirilmesi gerekir. Daha sonra rutin dışkı kontrol yöntemleri ile dışkıda yumurta ve halka bakısı yapılır. En geçerli yöntem dışkının tamamının sulandırılarak, bir süzgeçten geçirilmesi ve üstte kalan kısmının halka yönünden dikkatli kontrolüdür (Tiğın ve ark. 1991).

Hidatidozda klinik tablo çok farklı olup, kistler, her yaşta insan ve hayvanın bütün organlarında görülebilmekle birlikte özellikle karaciğer ve akciğerde bulunmaktadır (Ilıca ve ark. 2007). İnsanlarda sıklıkla klinik belirtiler gözlenmesine rağmen, hayvanlarda çoğunlukla hiçbir klinik belirti görülmez. Bir kistin varlığını onaylamak için görüntüleme tekniklerinin ve bunların sonucunu desteklemek amacıyla serolojik tekniklerin kullanımı gerekmektedir (Akyol, 2001).

#### 1.1.4.1. Görüntüleme Yöntemleri

Hidatidoz' un tanısında kullanılan başlıca görüntüleme yöntemleri şunlardır.

- Ultrasonografi (USG)
- Bilgisayarlı tomografi (BT)
- Manyetik rezonans Görüntüleme (MR)
- X - Ray (Röntgen)

Herhangi bir organı izleme olanağı sunan BT, daha küçük kistleri saptaması, boyutlarını ölçmesi, parazitik kist oluşumlarını parazitik olmayanlardan ayırt edebilmesi nedeniyle USG' ye oranla daha üstündür. Ancak BT' nin yüksek maliyeti kullanımını kısıtlamaktadır (Akyol, 2001).

#### 1.1.4.2. Serolojik Yöntemler

Günümüzde hidatidozun radyolojik tanı yöntemleriyle teşhis edilmeye çalışılmasına rağmen kistin tümör, apse gibi olgularla ayırıcı tanısının yapılabilmesi için serolojik tanı yöntemleriyle desteklenmesi gerekmektedir. Hidatidoz'un tanısında kullanılan başlıca alerjik ve serolojik testler şunlardır (Akyol, 2001):

- Casoni deri testi
- Kompleman fiksasyon testi (CF) (Weinberg)
- Latex Aglutinasyon (LA) Testi
- Indirekt Hemaglutinasyon (IHA) Testi
- Immunodiffüzyon (ID) ve Immunoelektoforez (IE) Testleri
- Indirekt Fluoresan Antikor (IFA) Testi

- Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Testi
- Blotting yöntemleri
- Bentonit Flocculasyon (BF)
- Double Diffusion 5 (DD5)

Kist hidatik genetik materyali (PCR) gibi daha ileri tekniklerle kolayca saptanabilmekte ise de şu sıralarda kullanımını genelde araştırma amaçlı olup kısıtlıdır (Akyol, 2001).

Veteriner hekimlikte klinik teşhis hemen hemen imkansızdır; çünkü teşhise yardımcı olacak karakteristik bir semptom tespit edilemez. Türkiye’de serolojik testlerin kullanımını ile ilgili yapılan bir çalışmada IFAT’ ın % 78.95, IHAT’ ın ise % 78.29 sensitivite gösterdiği bildirilmiştir (Akyol, 2001).

Kesin teşhis otopsi ile konur. Hidatik kistler kalın ve opak oluşu, delince fıskıracak derecede basınçlı kist sıvısı içermesi, fertil kistlerde protoskolekslerin bulunması, kist cidarının suya batırıldığında boru gibi kıvrılması ile hidatik olmayan kistlerden kolayca ayrılır (Akyol, 2001).

### **1.1.5. Sağaltım**

#### **1.1.5.1. Son konaklarda sağaltım**

Kedi ve köpeklerde ekinokok enfeksiyonlarının sağaltımında çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Bunlardan başlıcaları şunlardır:

Arecoline hydrobromide: Köpeklerde ağız yolu ile 1-2 mg/kg dozda verilmektedir. Kedilerde bronşial sekresyonu artırıp boğulmalarına neden olduğundan kullanılması tehlikelidir. Önceleri köpeklerde ekinokok enfeksiyonlarının sağaltımında kullanılan bu ilaç günümüzde daha çok teşhis amacıyla kullanılmaktadır (Tiğın ve ark. 1991).

Bunamidine hydrochloride: Ağız yoluyla 40-100 mg/kg dozda 2-3 kez verilen ilacın *E. granulosus* ve *E. multilocularis*'e yüksek etki gösterdiği bildirilmiştir (Güralp, 1981; Tiğın ve ark. 1991).

Mebendazole: Normalde nematodlara karşı kullanılan bu ilacın, *E. granulosus*' un larvalarına karşı da etkili olduğu bildirilmiştir. Mebendazol' un 10 mikrondan daha küçük parçalara ayrılmış (mikronize edilmiş) formülasyonu *E.granulosus*' un genç ve erişkinlerine % 100 etkili bulunmuştur. Tablet formülasyonunun etkisi ise daha küçük olmuştur (Tiğın ve ark. 1991).

Praziquantel: Son yıllarda geliştirilen bu ilacın, ekinokok enfeksiyonlarına karşı en etkili ilaç olduğu bildirilmektedir. Ağız yoluyla yada i.m. olarak 2.5-5 mg/ kg. dozda bir defa verilen ilacın genç ve erişkin ekinokoklara % 100 etkidiği bildirilmiştir (Tiğın ve ark. 1991).

Epsiprantel: Yapı olarak praziquantele benzeyen bu ilacın tablet formülasyonu köpeklerde 5.5 mg /kg, kedilere 2.75 mg/kg dozda uygulanır. Epsiprantel etki dozunda verildiği zaman köpeklerde 28-41 günlük *E. granulosus*'ların ortalama %99.9 unu elimine eder. Güvenirlik endeksi köpekler de 90, kediler de ise 36 olduğunu ve praziquantele oranla daha az emildiğini ilgili literatürlere göre bildirmiştir. (Çırak 2004).

Niklosamid: Gerek insan gerekse köpeklerin sestod enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanıldığı ve *E. granulosus*'a yüksek dozlarda (500 mg/kg)

etkidiği bildirilmiştir (Tiğin ve ark. 1991).

Bunların dışında nitroscanate, fospirate'ın da ekinokok enfeksiyonlarında oldukça yüksek etki gösterdiği, ancak parazitlerin tamamen vücuttan atılmaları için uygulamasının birkaç kez tekrarlanması gerektiği kaydedilmiştir (Tiğin ve ark. 1991).

Ekinokok enfeksiyonlarına karşı kullanılan ilaçlar genelde ge parazitlere erişkin parazitlerden daha az etkili bulunmuştur. Bunun, ge parazitlerin bağırsak villusları arasında genellikle daha derince yerleşmesinden, böylece konağın mukoza salgısının bunları ilacın etkisinden korumasından ileri geldiği bildirilmiştir (Tiğin ve ark. 1991).

Ekinokok enfeksiyonlarına karşı köpeklerde bağışıklık oluşturma çalışmalarında kesin bir sonuç elde edilememiştir. Deneysel çalışmalarda köpeklerin bağışık olabilmesi için parazitlerin seksüel gelişmesini geçirmesi gerektiği ve böyle köpeklerde parazitlerin sayısında, büyüklüğünde ve yumurta üretimlerinde azalma olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte bazı bağışık köpeklerle kontroller arasında belirgin bir fark görülmediği gibi direnç oluşturulan bazı köpeklerin de daha sonraki enfeksiyonlara duyarlı olabildiği saptanmıştır. Olgun parazitlerden elde edilen salgı antijenleri kullanılarak direnç oluşturulan köpeklerde, parazitin yumurta üretiminin önemli ölçüde durduğu kaydedilmiştir (Tiğin ve ark. 1991).

#### **1.1.5.2. Arakonaklarda sağaltım:**

Koyun, keçi ve sığır gibi kasaplık hayvanlarda ekinokok larva formlarının sağaltımında, operatif girişimler anlamsız olmakta bazı ilaçların (Albendazol, mebendazol, thiabendazol, cambendazol, fenbendazol, oxfendazol, praziquantel) etkili olduğu, ancak bu ilaçların etki dozlarının genellikle

yüksek olması, uzun süre uygulama gerektirmesi nedeniyle sağaltımın çok pahalı ve pratik olmayışı, ayrıca kasaplık hayvanlar da bu denli yoğun ilaç kullanımı sonucu et ve sütte bulunacak ilaç kalıntısının insan sağlığı açısından da sakınca yaratması veteriner hekimlikte ekinokok kistlerinin ilaçla sağaltımında anlamsız olduğunu ilgili literatürlere bağlı olarak bildirmiştir. Bu araştırmacılar tarafından kist hidatikle deneysel olarak enfekte edilen kuzularda, mebendazol, thiabendazol, cambendazol, praziquantelin etkili olduğunu bildirilmiştir (Çırak 2004, Tınar 1979).

İnsanlarda kist hidatiğin tedavisi 1970' li yıllarda, sağaltımın yalnızca operatif olduğu kabul edilmekteydi. Bu operasyonlarda da perforasyon, enfeksiyon, fistül oluşumu gibi komplikasyonlar söz konusudur.

Cerrahi müdahaleler başlıca üç şekilde yapılmaktadır:

- 1- Kistli organ veya dokunun total ya da parsiyel çıkarılması (Akciğerden segmentektomi, karaciğerden lobektomi, splenektomi v.s.)
- 2- Intakt uniloküler kistin patlatılmadan (Beyin, akciğer) bütünüyle çıkarılması
- 3- Perikist açıldıktan sonra kist sıvısının çevreye bulaştırılmadan germinal membranın çıkarılması.

Bu son şekilde, kist olduğu gibi bırakılabilir, kapitone edilebilir, içe veya dışa drene edilir ya da omentoplasti gibi endojen bir yapı ile kist boşluğu doldurulur. Bu operasyonlarda rekürrensün önlenmesi amacıyla, skolisidal madde (Formalin, hidrojen peroksit, iodin, cetrimid, hipertonic HCL, gümüş nitrat) gibi maddelerin belirli konsantrasyonlarda, belirli sürelerde uygulaması önem taşımaktadır (Çoker ve Zeytinli 2004).

Cerrahi girişimlerde başarının artması için;

- Preoperatif dönemde kemoterapi uygulanmalı
- Mümkünse operasyona ölü kist ile girilmesi
- Kistin ruptüre edilmeden çıkarılması
- Kemoterapi postoperatif dönemde de devam edilmeli (Çoker ve Zeytinli 2004).

Hastalığın kemoterapi yolu "Benzimidazole carbomate" lı bileşiklerin (Mebendazol, albendazol, flubendazol, thiabendazol, cambendazol gibi) bulunması ile mümkün olmuştur. Bu gibi ilaçlar arasında en popüler olanları ise mebendazol, albendazoldür (Kılıçturgay 2004).

- Mebendazol 50 - 200 mg / kg / gün 3 ile 12 ay
- Albendazol 10 - 15 mg / kg / gün bir aylık kürler (Kılıçturgay 2004).

Cerrahi tedavideki yüksek mortalite, morbidite ve rekürrens oranları, tıbbi tedavinin ise tek başına yeterli olmayışı alternatif tedavi arayışlarını devam ettirmiştir. Son zamanlarda PERKÜTAN yöntemi kullanılmaktadır. İki ile dört hafta, mebendazol 50 mg / kg / gün veya albendazol 10 mg / kg / gün ile tedavi sonrası ultrason veya ultrason + flaroskopli klavuzluğunda lokal anestezi ile girilerek kist sıvısı çekilir, hipertonic çözeltiyle yıkanır. Bu uygulama sonrası yeniden kemoterapi uygulanır (Akhan 2004).

#### 1.1.6. Koruma ve Kontrol

Hidatidoz bir yandan toplum sağlığını ciddi olarak tehdit ederken, diğer yandan da koyun, keçi, sığır gibi kasaplık hayvanlarda et, süt, yapağı ve döl

veriminin azalmasına, başta karaciğer ve akciğer olmak üzere kistli organların imhasına ve vücut direncinin kırılarak diğer hastalıklara yakalanma riskinin artmasına neden olarak ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir (Köktürk ve ark. 2002), (Şimşek ve ark. 2004), (Craig ve ark. 2007) Bu ekonomik kaybın, çiftlik hayvanlarında %7-10 süt verimi, %5-20 karkas ağırlığı %10-40 yapağı verimi kaybı oluşturduğu ve enfekte anneden doğan yavruların, enfekte olmayan anneden doğan yavrulara oranla doğum ağırlığının %20-30 oranında daha az olduğunu, Çivi ve ark.(1995) Türkiye için 1994 yılını baz alarak yıllık ekonomik zararın 1,705,050 ABD \$ olduğunu tahmin etmişler, insanlarda ise ekonomik açıdan hasta başına ortalama olarak 1840 ABD \$ harcadığını bildirmişlerdir.

Hastalığın giderek daha büyük sağlık ve ekonomik sorun haline gelmemesi için ivedilikle eradike edilmesi gerekmektedir.

Kist hidatik'ten korunmak amacıyla aşı geliştirme çalışmalarında oldukça önemli adımlar atılmış ve EG95 aşısı geliştirilmiştir. EG95 aşısı parazit yumurtasındaki onkosferde bulunan bir proteini içermektedir. EG95 aşısının hayvanlarda ticari olarak kullanılabilmesi için araştırmalar ve saha denemeleri devam etmektedir (Akyol, 2001; Köktürk ve ark. 2002).

*E.g. granulosus*'un yayılmasını önlemek için:

- a) Köpekler periyodik olarak prepatent süre göz önüne alınarak paraziter ilaçlarla tedavi edilmelidir.
- b) Tedaviyi takip eden 3-5 gün boyunca dışkı toplanarak derince toprağa gömülmeli,
- c) Enfekte organların mezbahaların etrafına gelişi güzel atılmasının önlenmeli mezbahalara yakma fırınları sağlanmalı veya enfekte organlar pişirilmeli
- d) Kaçak hayvan kesimleri engellenmeli,

- e) Enfekte köpek dışkıyla bulaşabilecek sebze ve meyveler yenilmeden önce bol suyla yıkanmalı,
- f) İnsanların hijyen ve sanitasyon hakkında eğitimine önem verilmeli, ayrıca halkın zoonoz hastalıklar konusunda medya ve yazılı basın tarafından sürekli veya periyodik sürelerde bilgilendirilmesi sağlanmalıdır (Akyol, 2001; Köktürk ve ark. 2002).

## **1.2. Glikoproteinler**

### **1.2.1. Tanım**

Glikoproteinler polipeptid iskeletlerine kovalan olarak bağlı oligosakkarit (glikan) zincirlerini içeren proteinlerdir (Gottschalk, 1972; Emekli, 1981; Gabius ve Gabius, 1997; Murray ve ark.1996). Glikoproteinler glikokonjugatların veya karma karbonhidratların bir sınıfıdır. Bunlar protein veya lipidlere kovalan olarak bağlanmış bir veya daha fazla sayıda karbonhidrat zinciri içeren molekülleri belirtmek için kullanılan eşanlamlı terimlerdir (Feizi, 1991; Faillard, 1998). Kısaca karma karbonhidratların üç sınıfı olan glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikolipidler genellikle hep birlikte "Glikokonjugat" olarak adlandırılırlar (Karaçalı, 2003).

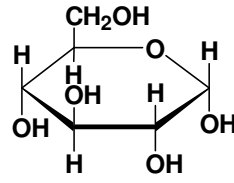
### **1.2.2. Glikoproteinlerin Yapısı**

Glikoproteinlerin karbonhidrat zincirleri çoğunlukla dallanmış yapıdadır ve negatif yüklü olmayabilir. Glikoproteinler çok değişik miktarda karbonhidrat içerirler. Örneğin immunglobulin G kütlesinin %4'ü kadar, kollajen genellikle %1'den az, ribonükleaz B %8, eritrosit zarında bulunan glikoforin %20'den

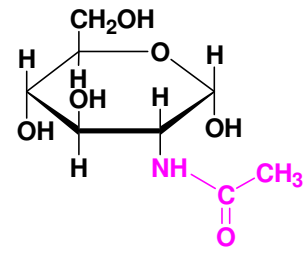
fazla, gastrik glikoprotein olan msin ise %60'dan fazla, kan grubu maddeleri ise %85'e kadar , mukopolisakkaritler ise %100'e yakın karbonhidrat içerir (Champe ve Harwey, 1994; Montgomery ve ark. 1996). Zarlara bağlı glikoprote-inler pek çok hüresel olayda görev alırlar. Örneğin hormonlar, virüsler ve bağka maddeler tarafından hücre yüzeyinin tanınmasında ayrıca hücre yüzey antijenleri (kan grubu antijenleri), hücre dığı matriksin elemanı, gastrointestinal ve ürogenital yolun msin salgısı olarak görev yaparlar. Bunların yanında albümin hariç plazmadaki globuler proteinlerin hemen hepsi, salgılanan enzimler ve proteinler glikoprotein yapısındadırlar (Champe ve Harvey, 1994).

#### **1.2.2.1. Glikoproteinlerin Yapısında Bulunan Şekerler**

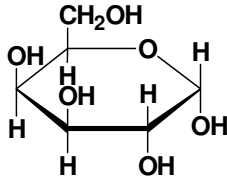
Glikoproteinlerin karbonhidrat kısmında bağlıca 7 eğit monosakkarid bulunur. Bu monosakkaridler o kadar değiğik sıralama ve farklı bağ yapıları ile bir araya gelirler ki sonuçta çok sayıda karbonhidrat zinciri yapısı ortaya çıkar. Glikoproteinlerde yer alan monosakkaridler ağağıda gsterilmiğtir. (Şekil 1.2)



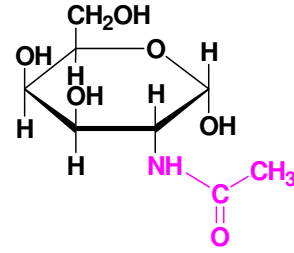
D-Glikoz



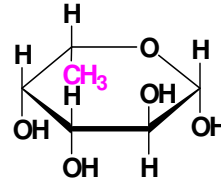
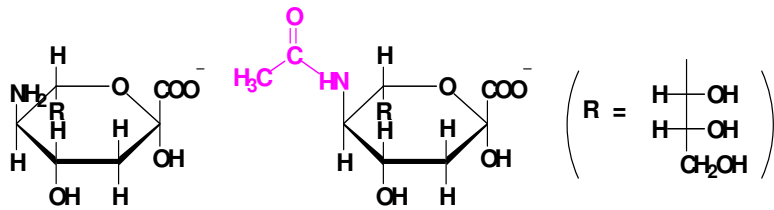
N-Asetil- D-Glikozamin



D-Galaktoz



N-Asetil-D-Galaktozamin

 $\beta$ -L-Fukoz

Neuraminik asit

N-Asetil Neuraminik asit

Şekil 1.2. Glikoproteinlerde en yaygın bulunan şekerler (Varki ve ark. 1999).

- Glikoz (Glc) sadece kollajende bulunur. N bağı glikoproteinlerin sentezi sırasında yer alır, olgun glikoproteinlerde bulunmaz (UDP-glikoz).
- Galaktoz (Gal) N bağı glikoproteinlerde bulunur (UDP-Gal).

- MannoZ (Man) N bağlı glikoproteinlerde sık bulunur (GDP-Man).
- N-asetil galaktozamin (Gal-NAc) Hem N hem O bağlı glikoproteinlerde bulunur (UDP-Gal-Nac).
- N-asetil glikozamin (Glc-Nac) N bağlı glikoproteinlerde Asn üzerinden bağlanır ( UDP-Glc-NAC).
- Fucoz (Fuc) ( 6 deoksigalaktoz) Hem N hem O bağlı glikoproteinlerde dışta yer alır ( GDP-Fuc).
- N-asetil nöraminik asit (NANA) (siyalik asit)(şekil 1.3.) hem N hem O bağlı glikoproteinlerin uç şekeridir.
- Arabinoz (Ara) Pentoz (UDP-Ara).
- Ksiloz (Xyl) Pentoz (UDP- Xyl) (Yavuz, 2001; Altıntaş ve ark. 2004).

Sialik asitler (N-asetil neuraminik asit, N-glikolil neuraminik asit) glikoproteinlerde ve glikolipid-lerde en yaygın bulunan ve en önemli şekerlerdir.

#### **1.2.2.2. Glikoproteinlerin Yapısında Bulunan Aminoasitler:**

Bütün aminoasitler farklı oranlarda glikoproteinlerin yapısında yer alabilirler. Oligosakkarit zincirleri glikoproteinlerin peptid omurgasına 5 amino asit artığından birinden bağlanmışlardır (Champe, 1994; Gabius ve Gabius, 1997; Montgomery ve ark. 1996; Murray ve ark. 1996; Yavuz, 2001). Bunlar; Asparajin (Asn), Serin (Ser), Treonin (Thr), Hidroksilizin (Hyl) veya Hidroksiprolin (Hyp)'dir.

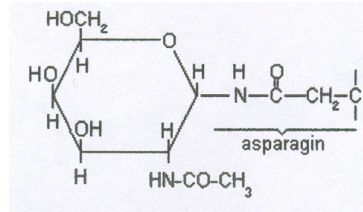
### 1.2.3. Glikoproteinlerin Sınıflandırılması

#### 1.2.3.1. İçerdikleri Bağ Tipine Göre Glikoproteinlerin Sınıflandırılması

İçerdikleri bağ tipine göre glikoproteinler üç ana sınıfa ayrılırlar.

#### N-Glikozidik Bağ İçerenler:

Bu sınıfa ait glikoproteinlerde şeker asparajin yan zincirinin amid grubuna bağlanır (Şekil 1.3.). Ovalbumin, immunglobulinler, orosomukoid başlıca N bağlı glikoproteinlerdir (Nigam ve Cantero, 1973; Akman, 2002).



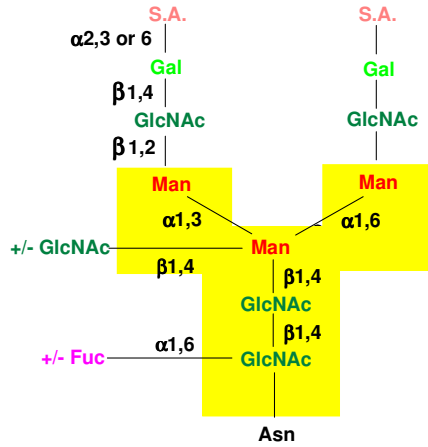
**Şekil 1.3.** Bir N bağlı glikoprotein (N asetil glikozaminin asparajine bağlanması) (Murray, 1996).

N bağlı glikoproteinlerde 3 ana sınıf oligosakkarit bulunur:

- a. Karma oligosakkaritler
- b. Mannozdan zengin oligosakkaritler
- c. Melez oligosakkaritler (Murray ve ark 1996; Varki ve ark. 1999) dir.

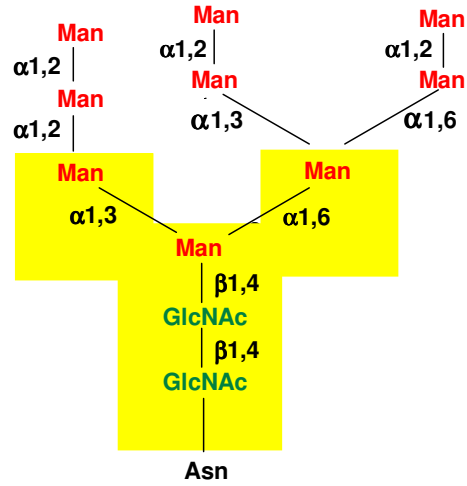
Her 3 sınıf glikoproteinde de ortak bir pentasakkarit çekirdek bulunur. (Man3 Glc NAc2) Bu ortak pentasakkaritin varlığı bunların biyosentezlerinde ortak bir başlangıç mekanizmasının bulunması ile açıklanır.

Karma tip glikoproteinler genellikle uç NeuAc kalıntıları ile tabanda yatan Gal ve GlcNAc kalıntıları içerir. (Şekil 1.4.). Bunların çoğu 3 veya 4 tane dış dal içerirlerse de 5 dal içeren çatılar da yayınlanmıştır. (Oligosakkarit dallarına çoğunlukla anten adı verilir.) Karma tip zincirler şaşırtacak kadar çok sayıda olup aşağıdaki şekilde bunlardan sadece bir tanesi verilmiştir. Diğer karma zincirler Gal veya Fuc ile sonlanabilir. (Murray ve ark. 1996) Karma glikoproteinler hayvan glikoproteinlerinde bulunur. 100'den fazla tipinin belirlenmiş olması kimyasal işaretleme ve tanıma olaylarında karbonhidratların farklılığını gösterir (Nelson ve Michael 2000).



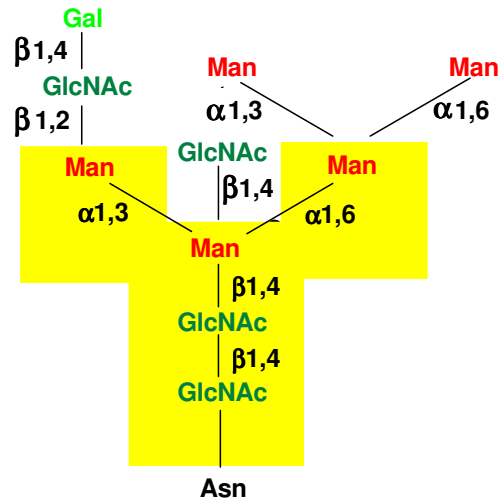
Şekil 1.4. Karma tip glikoprotein (Murray, 1996).

Mannozdan zengin oligosakkaritler tipik olarak, pentasakkarit çekirdeğe bağlı 2-6 ek Man kalıntısı içerirler (Şekil 1.5.). Bütün N bağlı oligosakkaritler başlangıçta mannozdan zengin yapılar halinde oluşurlar, daha sonra farklı tipte kompleks oligo-sakkaritlere farklılaşırlar. Bunlar hayvan glikoproteinleri içinde sınırlı sayıda yer alırlar. Daha çok düşük ökaryotlarda ve viral zarf glikoproteinlerinde bulunurlar (Elbein, 1999; Kobata, 1992).



Şekil 1.5. Mannozdan zengin oligosakkarit (Murray, 1996).

Melez oligosakkaritler ise diğer iki sınıfın her ikisine ait nitelikleri de taşırlar (Şekil 1.6.).

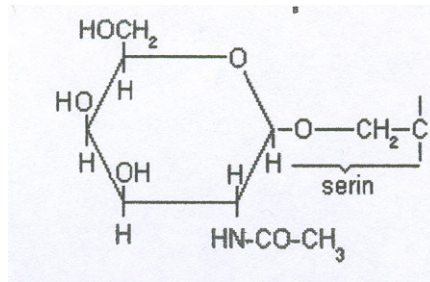


Şekil 1.6. Melez oligosakkarit (Murray, 1996).

N bağlı glikoproteinler glikoproteinlerin ana sınıfını oluşturur. Kolayca erişilebilen proteinler (örn. Plazma proteinleri) esas olarak bu gruba ait oldukları için bu glikoproteinler daha fazla incelenmiştir. Bu grupta hem zara bağlı hem de dolaşımda yer alan glikoproteinler bulunur.

### O-Glikozidik Bağı İçerenler:

Bu sınıfa ait glikoproteinlerde şeker serin veya treoninin R grubunun hidroksiliyle bağlanır (Şekil 1.7). Birçok membran proteini, müsinler, proteoglikanlar, kollajenler başlıca O bağı glikoproteinlerdir (Lennarz, 1980; Anumula, 2000; Yavuz, 2001).



**Şekil 1.7.** Bir O bağı glikoprotein (N asetil galaktozaminin serine bağlanması) (Murray, 1996).

### 1.2.3.2. Buldukları Yere Göre Glikoproteinlerin Sınıflandırılması (Faillard, 1998)

1. Memeli Glikoproteinleri
  - a. Gastrointestinal kanal glikoproteinleri
    - i. Mide-bağırsak sıvısının mukus materyali
  - b. Diğer Glikoproteinler
    - i. Solunum yolu glikoproteinleri
    - ii. Genital kanal glikoproteinleri
    - iii. Amniyon sıvısı glikoproteinleri
    - iv. Eklem sıvısı glikoproteinleri
  - c. Kan Plazması Glikoproteinleri
  - d. Konnektif Doku Glikoproteinleri
  - e. Üriner Glikoproteinler
  - f. Muhtelif glikoproteinler
2. Balık ve İntervertebralı Glikoproteinleri

3. Bitki Glikoproteinleri
4. Viral Glikoproteinler
5. Bakteriyel Glikoproteinler

#### **1.2.4.1. Glikoproteinlerin Oligosakkarit Zincirlerinin Fonksiyonları**

- Hücre içinden ve dışından gelen proteolize karşı korunma sağlar.
- Öncül proteinlerin daha küçük ürünlere proteolitik işlemlenmesini etkiler.
- Fizikokimyasal nitelikleri (örn: çözünürlük,akışkanlık,yük ve denaturasyon) değiştirir.
- Biyolojik etkinliğe katılır (örn: koriyonik ganadotropini).
- Zarlara yerleşmeyi, hücre içi göçü, sınıflandırılmayı ve salgılamayı etkiler.
- Embriyonik gelişmeyi ve farklılaşmayı etkiler.
- Kanseri hücreleri tarafından seçilen metastaz noktalarını etkiler (Murray, 1996; Yavuz, 2001).

#### **1.2.5. Glikoproteinler ve Parazitizm**

Bazı protozoal ve helmintik parazitler parazitizmlerini sağlamak için genellikle antijenik olan ve konağa invazyonda gerekli olan karbonhidrat bağlı proteinlere (glikoprotein) ihtiyaç duyarlar. Şimdiye kadar yapılan bir çok çalışma parazit türevli lektin ve glikanların parazitler enfeksiyonlarda rolü

olduğunu gösterse de günümüzdeki çalışmalar glikokonjugatların bir çok parazit için her hangi bir rolden öte son derece önemli olduğunu ifade etmektedir (Varki, 1999). Ayrıca glikozile edilmiş proteinlerin doğal ve deneysel hidatik enfeksiyonlarındaki immundominant özellikleri (Khoo ve ark.,1997), onları diğer proteinler içinde öne çıkarmaktadır.

Kist hidatik glikoproteinlerine yönelik ilk çalışmalar 1953 yılında Cmelik ve Briksi ile başlamış olup, araştırmacılar kist duvarının protein ve karbonhidrat kompleksinden yapıldığını açıklamışlardır (Ghourri ve ark. 1971). Günümüzde önemi daha da anlaşılan glikoproteinler gelişen moleküler teknikler sayesinde çok daha ayrıntılı şekilde incelenmektedir.

Bu alanda gelecekteki çalışmalar büyük olasılıkla parazit glikokonjugat sentezini engelleyecek ya da konak reseptörlerinin paraziti tanımasına engel olan ilgili faktörleri ortadan kaldırmaya yönelik yeni ilaçların geliştirilmesi doğrultusunda olacaktır. Buna ek olarak, bir çok parazitin hücre adhezyonu için sentezlediği ve salgıladığı spesifik lektinleri hedef alan aşılarda enfeksiyonları sınırlamada kısmen etkili olabilirler (Varki ve ark. 1999).

### **1.2.6. Glikoproteinlerin Antijenik Özellikleri**

Protein ve glikoproteinler hücre içi iletişimi sağlamada etkili elemanlardır ve bunlar hiç kuşkusuz larval parazitlerin fizyolojik aktivitelerini etkiler. Karbonhidrat fraksiyonundaki herhangi bir değişiklik biyolojinin değişmesine neden olabilir (Warren ve ark. 1978'e atfen Ghorui ve ark. 1990). Ayrıca protein ve glikoproteinlerin detaylı analizleri konak-parazit arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına böylece immun cevabın araştırılmasındaki eksik bilgilerin tamamlanmasına yardımcı olacaktır. Proteinlerin bir çok kompleks oligosakkarit yapılarla dekore edilmiş olmasının nedeni uzun süre anlaşılammış ancak son yirmi yılda glikobiyoloji alanındaki gelişmeler

glikolizasyonun rolünün kısmi olarak anlaşılmasını sağlamıştır. Protein glikozilasyonu proteinlerin en yaygın posttranslasyonel modifikasyonudur ve proteinin antijenik özelliklerine katkıda bulunur. Bağışıklık sisteminde yer alan çoğu molekül de (hücre reseptörleri, sitokinler, antikorlar) glikozile şekilde bulunurlar. Glikozilasyona uğramış proteinler farklı tip antijenik epitoplara taşırlar (Lisowska, 2002), (Walsh ve Jefferis 2006) ve glikoproteinler immun sistem efektörlerinin anahtar komponentleridirler (Rudd ve ark. 2001), (Zhang, 2006).

### **Tezin amacı:**

Yapılan bu tez çalışmasında;

1. Doğal enfekte koyun ve deneysel enfekte farelerde hidatik kist materyallerinin (kist sıvısı, membran, protoskoleks) antijenik proteinlerinin belirlenmesi
2. Belirlenen antijenik proteinlerde karbonhidrat varlığının araştırılması
3. Koyun ve fare kökenli hidatik kist materyallerinin antijenik proteinler ve glikoproteinler yönünden karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, koyun ve farelerde yapılacak uygulamalar için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'ndan 29 Aralık 2004 tarihinde onay alınmıştır.

### 2.1. 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 karaciğer ve kan örnekleri alındı. Ticari olarak birer adet enfekte olmayan koyun ve fare serumları temin edildi.

Örnekler en kısa sürede laboratuvara getirilerek kanların serumları ayrıldı ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Koyun karaciğerinden toplanan kist hidatik sıvısı  $10.000 \times g$ 'de 30 dakika santrifüj edilerek protoskoleksler çöktürüldü. Üstte kalan kist hidatik sıvısı alınarak  $0.45 \mu\text{m}$ 'lik membran filtreden geçirildi. Daha sonra solusyon diyaliz torbasına konularak 36 saat distile suya karşı  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de diyaliz edildi. Böylece tuzlarından arındırılarak hazır hale gelen kist hidatik sıvısı antijeni  $-80^{\circ}\text{C}$ '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  $0,45 \mu\text{m}$ 'lik membran filtreden geçirildi ve solusyon diyaliz torbasına konularak 36 saat distile suya karşı  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de diyaliz edildi. Hazır hale gelen protoskoleks antijeni  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Kist hidatiklerin sıvıları ve protoskoleksleri yanısıra kist hidatik memblanları 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.

## 2.2. Farelerin Deneysel Enfeksiyonu

Farelerin deneysel enfeksiyonu için 15-25 günlük 30 adedi enfekte edilmek, 10 adedi kontrol olmak üzere toplam 40 beyaz fare (Swiss albino) kullanıldı. Denemeler için gerekli *E. g. granulosus* protoskoleksleri toplanan fertil ekinokok kistlerinden elde edildi. Kist sıvısı alınan proskoleksler 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 penicilin, 0.001 g streptomisin bulunacak şekilde antibiyotik eklendi. Enfekte edilecek 30 fareye hazırlanan süspansiyondan 0.5 ml'lik bir enjektörle karın boşluğuna verildi. Çalışmada kullanılacak enfekte fare sayısına ulaşıncaya kadar bu işlem tekrarlandı. Kistlerin gelişmesi için 7 ay beklendi ve süre sonunda fareler elden çıkarılarak serumlar elde edildi ve aynı zamanda antijen hazırlanması amacıyla otopsileri yapılarak gelişmiş olan sekonder

kistler alınıp, kist sıvıları ve kist duvarları toplandı (Resim 2.1.). Elde edilen kist sıvıları, koyunlardan elde edilen primer kist hidatik sıvılarına yapılan işlemler tekrar edilerek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.



**Resim 2.1.** Deneysel olarak enfekte edilen farelerde otopsi sonucu elde edilen kistler.

### 2.3. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde bulunan; vertikal mini jel elektroforezi ve Semi-dry transfer (Blotting) cihazı (Hoeffer), güç kaynağı (Amersham), soğutmalı su banyosu (Amersham), GS-800 dansitometresi (Bio-Rad), ependorf santrifüj (Beckman), pH metre (Hanne), çalkalayıcı (Rock), sonikasyon cihazı (Bandelin) ve derin dondurucu ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) (New brunswick) kullanıldı. Protein bantlarının standart bantlarla karşılaştırılarak değerlendirilmesinde BIO-RAD "Quantity One moleküler imaj yazılımı" programı kullanılmıştır.

Bu çalışmada kimyasallar olarak; anti-sheep IgG-peroksidaz konjugatı (Sigma, A3415), anti-mause IgG-peroksidaz konjugatı (Sigma,

A4416), koyun serumu (Sigma, S3772), fare serumu, (Sigma, M 5905), nitroseluloz membranlar (Amersham, HoybondECL), PVDF membran (Amersham,Hy-bond-P), blotting kağıdı (Sigma, P4681) 3,3'-diamino-benzidin (DAB) (Sig-ma,D0426), 205-6,5 kDa protein standart belirteci (Sigma, S8445), 215-18.3 kDa prestained protein belirteci (Blue Ranger, 26681), tris-HCl (Sigma,T 1378), trizma (T1378), diyaliz tüpü (Sigma D0550), DIG Glikan tayin ve ayırt edici kitleri (Roche 11142372) deoksikolik asit (Sigma D2510), dithiothreitol (Sigma D9163) EDTA (Sigma E5513), akrilamid-bis akrilamid (Sigma, A3574), amonyum persülfat (Sigma, A3678), sodyum dodesil sülfat (Sigma, L4509), bromfenol mavisi (Sigma B5525), gliserol (Sigma, G8773), merkptoetanol (Merck, UN2966), TEMED (Sigma, T9281), coomassie mavisi (Sigma B8647) monobazik sodyum fosfat monohidrat (Sigma, S 3522), tween 20 (Sigma P5927), glasiyel asetik asit (Merck, 56), etanol (Riedel-de Haen, 32221), metanol (Riedel-de Haen, 24229), magnezyum klorür (Sigma M9272), sodyum klorür (Sigma S 9888), kalsiyum klorür (Sigma C1016), mangan klorür (Aldrich 22,127-9) kullanıldı.

#### **2.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)**

Proteinlerin ayırımı için en fazla kullanılan yöntemdir. SDS-PAGE proteinlerin karakterizasyonunda, karşılaştırılmasında ve saf olup olmadıklarının kontrol edilmesinde kullanılan, pahalı olmayan, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Bu nedenle kullanım alanı son derece geniştir. Bilindiği gibi, elektrofrez bir elektrik yüklü alanda iyonların göçü olayıdır. Proteinlerin elektrofrezinde, proteinin şekli, molekül kütlesi, ortamın pH'sı ve bu pH'da proteinin anyon veya katyon olması gibi özellikler nedeni ile farklı proteinler farklı göç hızı gösterirler ve birbirlerinden ayrı noktalara doğru hareket ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. SDS-PAGE yönteminde, proteinler anyonik bir deterjan olan SDS ile reaksiyona girerek negatif yüklü kompleksler oluştururlar. Protein tarafından bağlanan SDS miktarı ve dolayısıyla kompleks üzerindeki yük, proteinin büyüklüğü ile

orantılıdır. Proteinler genellikle SDS'ye bağlanmaktan ötürü denatüre olurlar ve çözünürlük kazanırlar, şekillerini değiştirirler.

Böylece proteinler (asidik ya da bazik) negatif yüklenmiş kompleksler olarak temelde yüklerindeki ve büyüklüklerindeki farklılığa dayanarak poliakrilamid jelin kalbura benzer gözenekli matriksinde elektroforez ile ayırma tabi tutulurlar.

SDS-PAGE, protein ayırımının yanında, molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerle bağlantılı olarak elektroforetik değişkenliklerin kıyaslanması ile bilinmeyen proteinlerin molekül ağırlıklarının teşhisinde oldukça geniş bir şekilde kullanılan güçlü bir yöntemdir.

SDS disülfid bağlar üzerine etkili olmadığı için beta merkaptotanol veya dithio-treitol ilavesi ile disülfid bağlar kırılır (Dryer ve Lata, 1989; Stott, 1989; Van ve ark., 1987; Zingales, 1984). Proteinlerin SDS ile muamelesinde 12 metilen grubuna sahip olan deterjan, sülfat iyonuna katılır ve indirgeyici ajan olan beta-merkaptotanol veya dithio-treitol disülfid köprülerini (-SH HS-) şeklinde ayırır ve bunların üç boyutlu şekillerini silindirik yapıya dönüştürür (Reynolds ve Tanford, 1970).

#### **2.4.1. SDS-PAGE'de Kullanılan Çözeltiler**

*Monomer çözelti:*

1.	Akrilamid	58,4 g
2.	Bisakrilamid	1,6 g
3.	H <sub>2</sub> O	200,0 ml

*4X Ayırma(Running) Jel Çözeltisi (pH 8,8):*

- |    |                  |          |
|----|------------------|----------|
| 1. | Tris             | 36,3 g   |
| 2. | H <sub>2</sub> O | 200,0 ml |

*4X Numune Yükleme (Stacking) Jel Çözeltisi (pH 6,8):*

- |    |                  |         |
|----|------------------|---------|
| 1. | Tris             | 3,0 g   |
| 2. | H <sub>2</sub> O | 50,0 ml |

*%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi :*

- |    |                  |          |
|----|------------------|----------|
| 1. | SDS              | 10,0 g   |
| 2. | H <sub>2</sub> O | 100,0 ml |

*%10 Amonyum persülfat (APS):*

- |    |                  |        |
|----|------------------|--------|
| 1. | APS              | 0,1 g  |
| 2. | H <sub>2</sub> O | 1,0 ml |

*Numune Çözeltisi (Sample buffer) (pH 6,8):*

- |    |                                             |        |
|----|---------------------------------------------|--------|
| 1. | 4X Numune Uygulama (Stacking) jel solusyonu | 2,5 ml |
| 2. | %10 SDS                                     | 4,0 ml |
| 3. | Gliserol                                    | 2,0 ml |
| 4. | Merkaptoetanol                              | 1,0 ml |
| 5. | H <sub>2</sub> O                            | 0,5 ml |

*N-butanol-su (1:1) çözeltisi:*

- |    |                  |         |
|----|------------------|---------|
| 1. | n-Butanol        | 50,0 ml |
| 2. | H <sub>2</sub> O | 50,0 ml |

*Tank çözeltisi (pH 8,3):*

- |    |                  |         |
|----|------------------|---------|
| 1. | Tris             | 12,0 g  |
| 2. | Glisin           | 57,6 g  |
| 3. | SDS              | 40,0 ml |
| 4. | H <sub>2</sub> O | 4,0 L   |

*Koşturma (Running) Jel Solusyonu:*

1. Monomer çözeltisi 5 ml
2. 4X Running jel tamponu 5,0 ml
3. %10 SDS 0,2 ml
4. H<sub>2</sub>O 8,3 ml
5. APS 100,0 µl
6. TEMED µ6,7 µl

*Numune Uygulama (Stacking) Jel Solusyonu.:*

1. Monomer çözeltisi 0,9 ml
2. 4X Stacking gel çözeltisi 1,6 ml
3. %10 SDS 66,0 µl
4. H<sub>2</sub>O 4,0 ml
5. APS 33,4 µl
6. TEMED 3,3 µl

*Blue-Silver Stain (Gümüş mavisi boyası):*

1. % 2 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
2. % 10 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
3. % 20 metanol
4. % 0,1 Coomassie G-250

*Tespit (Fikzasyon) çözeltisi:*

1. %40 etanol
2. %10 asetik asit

## **2.5. Koyun ve Farelerin Kist Sıvısı, Kist Membranı ve Protoskolekslerinde 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

(Lowry ve ark., 1951). Kist sıvılarında ortalama 0.173 mg/dl protein bulundu. Daha sonra %10'luk ayırma jeli, %4'lük numune uygulama jeli hazırlanarak 8x10cm'lik cam plaklar arasındaki 1,5 mm'lik boşluğa döküldü. Örnekler 2:1 oranında örnek tamponu ile karıştırıldı ve 5 dakika süreyle kaynar su banyosunda tutularak proteinlerin denaturasyonu sağlandı. Hazırlanan örnekler, kademeli jel sistemine yüklenerek, tris-glisin buffer sisteminde 20 mA sabit amperde izci boya (bromfenol mavisi) jelin sonuna ulaşınca kadar göç ettirildi. İşlem sonunda, jel sırasıyla 6 saat tespit (Fikzasyon) çözeltisini takiben Blue Silver (Candiano ve ark., 2004) boya çözeltisi ile boyandıktan sonra, %25 etanol çözeltisinde tutuldu ve bantlar görünür hale getirildi. SDS-PAGE'de 205-6,5 kDa arasındaki molekül ağırlıklı protein standardı kullanıldı. SDS-PAGE sonucunda görülen bantların molekül ağırlıkları Qantity One Analiz Yazılımı (BİO RAD) ile hesaplandı.

## 2.6. Western Blotting:

Western blot tekniği, kompleks bir karışımdaki çalışmaya spesifik olan proteinlerin tanımlanması ve buna bağlı olarak molekül ağırlıklarının belirlenmesi için kullanılan yöntemdir. Birkaç temel basamağa bölünerek incelenebilir (Daidson ve ark. 2007).

- Karışımdaki denatüre edilmiş proteinlerin Poliakrilamid jel üzerinde büyüklüklerine göre ayrılması.
- Ayrılmış proteinlerin pozisyonlarını koruyarak membrana aktarılması.
- Araştırma konusu olan proteinin spesifik antikolar ile reaksiyonu yardımıyla tayini ve molekül ağırlığı bilinen standart protein belirteçleri ile molekül ağırlıklarının belirlenmesi.

Birinci aşaması olan SDS-PAGE ile elektroforeze tabi tutulan proteinler transfere hazır hale gelirler. Bu aşamadan sonra uygulanacak olan Western blot yönteminin ana hatlarını şu şekilde sıralamak mümkündür:

- Seperasyona tabi tutulan proteinlerin nitroselüloz membrana (yada naylon veya benzeri materyallere) transfer edilmesi
- Spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için membran üzerindeki protein bağlanma kısmının bloke edilmesi (bloking)
- Transfer edilmiş ilgili proteine spesifik antikorun bağlanması
- Birinci antikora, enzim işaretli ikinci antikorun bağlanması
- Enzim bağlı kompleksin membrana uygun enzim-substrat solüsyonu uygulanarak yerleştirilmesi.

### 2.6.1. Western Blottingde Kullanılan Çözeltiler

*Fosfat Tuz Tampon (PBS) (pH 7,4):*

1. NaCl	8,0 g
2. KCl	0,2 g
3. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,4 g
4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g
5. H <sub>2</sub> O	1,0 L

## 2.7. Western Blotting (İmmunblotting) Tekniği ile Antijenik Yapının Analizi

Analiz edilen suşlardaki antijenik yapının belirlenmesi amacıyla Burnie ve ark. (1987) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Bu amaçla ilk olarak SDS-PAGE uygulandı. Membran belirteci olarak 30-120 kDa Prestained SDS-PAGE belirteci kullanıldı. Daha sonra nitroselüloz membran (Hybond-P) ve jel 10 dk transfer tamponunda tutuldu. Yarı-Kuru (semi-dry) blot cihazı kullanılarak 3 filtre kağıdı, nitroselüloz membran, jel ve tekrar transfer tamponla ıslatılmış 3 filtre kağıdı kullanılarak 100 V'ta 1 saat tutulmak suretiyle jeldeki proteinlerin membrana transferi sağlandı.

İmmunblotting yöntemi ile nitroselüloz membranda antijenik bant varlığı incelendi. Spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlemek için 5 g süt tozu, %0,05 (v/v), Tween-20 ve PBS (pH 7,4) karışımı içerisinde, oda ısısında 2 saat süre ile bekletildi. Primer antikor içeren serumlar 1/1 000 (v/v) oranında blocking buffer ile dilusyonu yapılarak oda ısısında 2 saat inkube edildi. Daha sonra PBS (pH 7,4) % 0,05 Tween-20 (v/v) karışımı ile üç defa 10 dakika ara ile yıkandı. Sekonder antikor (peroksidaze konjugat antisheep ve antimause immunoglobulin) 1/3 000 (v/v) oranında blocking buffer ile dilue edildi oda ısısında 1 saat tutuldu. Daha sonra PBS (pH 7,4) ve % 0,05 Tween-20 (v/v) karışımı ile üç defa 10 dakika arayla yıkandı.

Son olarak, taze hazırlanmış 3,3'-diaminobenzidin (DAB) çözeltisi kondu. Bu çözeltinin uygulanmasını takiben gri bantlar belirdi ve reaksiyon PBS ile durduruldu. İmmunblotting sonucunda görülen bantların molekül ağırlıkları Quantity One moleküler imaj yazılımı (Bio Rad) ile hesaplandı.

## 2.8. Glikan Tayin Kiti İle Glikoprotein Varlığının Belirlenmesi

*Glikan Tayin Kiti (DIG Glycan Detection Kit Roche, Cat. No. 11 142 372 001):* glikoprotein varlığının incelenmesi amacıyla kullanıldı.

### 2.8.1. Glikan Tayin Kitinin Kullanımı İçin Gerekli Çözeltiler

1. Blocking buffer	5,0 ml
2. TBS	45,0 ml

*Sodyum asetat solusyonu (pH 5,5):* Glikan tayin kiti ile yapılan glikoprotein analizinde kullanıldı.

1. Sodyum asetat	8,2 g
2. H <sub>2</sub> O	1,0 L

*Tris solusyonu (Tris Buffer Saline, TBS)(pH 7,5):* Glikan tayin kiti ile yapılan glikoprotein analizinde kullanıldı.

1. Tris-HCl	7,9 g
2. NaCl	8,8 g
3. H <sub>2</sub> O	1,0 L

*Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi (Fosfat Buffer saline, PBS) (pH 6,5) :* Glikan tayin kiti ile yapılan glikoprotein analizinde kullanıldı.

1. Potasyum Dihidrojen Fosfat	6,8 g
2. NaCl	8,7 g
3. H <sub>2</sub> O	1,0 L

### 2.8.2. Glikan Tayin Kitinin Kullanımı

Glikan tayin kiti (DIG Glycan Detection Kit) kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntem, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. SDS-PAGE'den sonra proteinler PVDF membrana aktarıldı. Membran 10 dakika arayla iki kez 40 ml PBS (pH 6,5) ile yıkandı 10 ml Sodyum asetat buffer'da hazırlanmış Sodyummetaperiodat ile oda ısısında 20 dakika inkübe edildi ve tekrar 10 dakika süreyle iki kez 40 ml PBS (pH 6,5) ile yıkandıktan sonra 5 ml sodyum asetat içerisinde 1µl D,G-succinly-ε aminocaproid asit hidrazid içeren solusyonda 1 saat süreyle oda ısısında bırakıldı ve 10 dk süreyle 3 kez 50 ml TBS ile yıkandı. Membran blocking solusyonunda en az 30 dakika tutuldu ve 10 dakika süreyle üç kez 50 ml TBS ile yıkandı. 15 µl anti-DIG alkaline fosfataz içeren 15 ml TBS (pH 7,5) içerisine konarak, 1 saat bekletildi ve 10 dakika süreyle üç kez 50 ml TBS ile yıkandı. Membran hareket ettirilmeden substrat (x-fosfat –NBT içerisinde TBS pH 9,5) konuldu ve bantlar belirgin hale gelince bol distile su ile yıkandı. Oluşan bantların molekül ağırlıkları Qantity One Moleküler İmaj Yazılımı (Bio Rad) ile hesaplandı.

### 2.9. Glikan Ayırtedici (Diferensiasyon) Kiti ile Glikoproteinlerin Ayrımı

*Glikan Ayırt Etme Kiti (DIG Glycan Differentiation Kit, Roche, Cat. No. 11 210 238 001):* glikoprotein bağlanma tiplerini araştırmak amacıyla kullanıldı.

*Tris Buffer Saline (TBS) (pH 7,5) :* Glikan ayırt etme kitinde kullanıldı.

### 2.9.1. Glikan Ayırteci (Diferensiasyon) Kitin Kullanımı İçin Gereklil özeltiler

1.Tris-HCl	6,0 g
2.NaCl	8,7 g
3. H <sub>2</sub> O	1,0 L

#### *Tampon1 (pH 7,5):*

1.MgCl <sub>2</sub>	0,05 g
2.CaCl <sub>2</sub>	0,03 g
3.MnCl	0,05 g
4.TBS	250,0 ml

#### *Tampon 2 (pH 9,5):*

1.Tris-HCl	12,1 g
2.MgCl <sub>2</sub>	10,2 g
3.NaCl	5,9 g
4. H <sub>2</sub> O	1,0 L

### 2.9.2. Glikan Ayırteci (Diferensiasyon) Kitin Kullanımı

Glikan ayırteci kiti (DIG Glycan Differentiation Kit) kullanılarak yapılan bu işlem, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Buna göre, ilgili kısımda anlatıldığı şekilde yapılan SDS-PAGE ve membrana transfer sonrasında, membran 5 ml Bloklama ayıracı ve 45 ml TBS (pH 7,5) içerisinde en az 30 dakika bekletildi. 2 defa 10'ar dakika süreyle 50 ml TBS ve bunun sonrasında da bir kez Tampon 1 solusyonu ile yıkandı. Bu işlemi takiben bağlanma tiplerini araştırmak amacıyla *Maackia amurensis agglutinin* (MAA) Sialik asit alfa (2-3) ile galaktoz arasında, *Galanthus nivalis agglutinin* (GNA) mannoz, alfa (1-3), alfa (1-6) yada (1-2) ile mannoz arasında, *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz

arasında, *Peanut agglutinin* (PNA) galaktoz beta (1-3) ile N-asetilgalaktozamin arasında ve *Datura stramonium agglutinin* (DSA) galaktoz beta (1-4) ile N-asetilgalaktozamin spesifik lektinler uygulandı. 10 ml Tampon 1 ile karıştırılıp membranların üzerine kondu ve 1 saat beklendi. Lektin çözeltisinden çıkartılan membran, 3 defa TBS (pH 7,5) ile yıkandı, anti-Digoxigenin-AP 10 µl alınarak, 10 ml TBS ile karıştırıldı ve membranların üzerine uygulandı. 1 saat beklendi. Membran 3 defa 10 dakika süreyle TBS (pH 7,5) ile yıkandı. 10 ml Tampon 2 ve 200 µl substrat (NBT X-fosfat) karışımı membranın üstünü kaplayacak şekilde uygulandı. Bantlar oluşunca, reaksiyon distile su ile yıkanarak durduruldu ve bant oluşumu değerlendirildi.

### **3. BULGULAR**

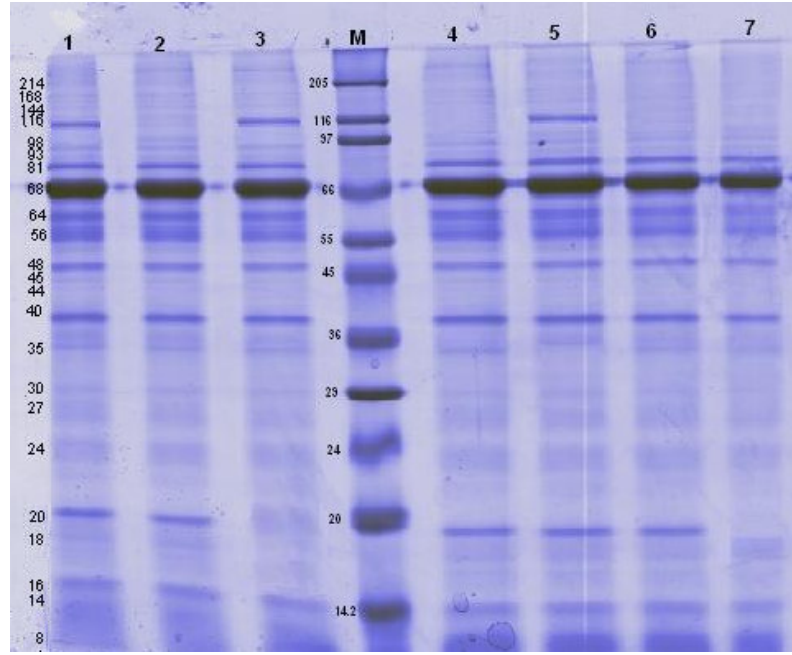
#### **3.1. Koyunlarda Kist Hidatik Protein Profillerinin, Antijenik Proteinlerinin ve Glikoproteinlerinin Belirlenmesi**

##### **3.1.1. Koyunlarda Kist Hidatik Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi**

Protein profillerini belirlemek amacıyla koyun kist sıvısı, kist membranı ve protoskoleks örnekleri kullanılarak denatüre koşullarda ve kademeli jel sistemi ile vertikal elektroforez yapıldı. SDS- PAGE üzerinde 205-6.5 kDa (Sigma, S8445) arasında molekül ağırlığına sahip protein standartları kullanıldı.

##### **3.1.1.1. Koyunlara Ait Kist Sıvısı Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi**

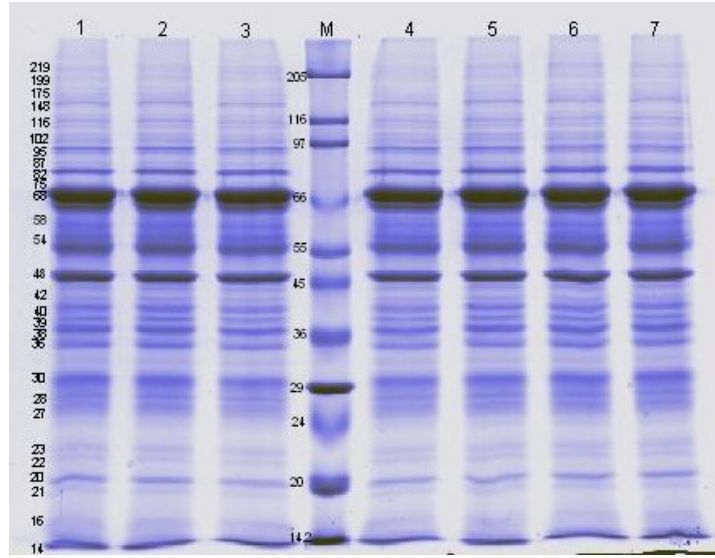
SDS-PAGE'de 7 adet koyun kist sıvısı antijeni kullanıldı. Koyun kist sıvılarında 214-8 kDa arasında 25 adet bant bulundu. Bu bantlar 214, 168, 144, 116, 111, 98, 93, 81, 68, 64, 60, 58, 48, 45, 44, 40, 35, 30, 26, 24, 20, 18, 16, 14 ve 8 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Koyun kist sıvısı proteinlerin SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları. 1-7 arası numaralar farklı hayvanlardan alınmış kist sıvısı örneklerini ifade etmektedir. M: Marker (Protein belirteci).

### 3.1.1.2. Koyunlara Ait Kist Membranı Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi

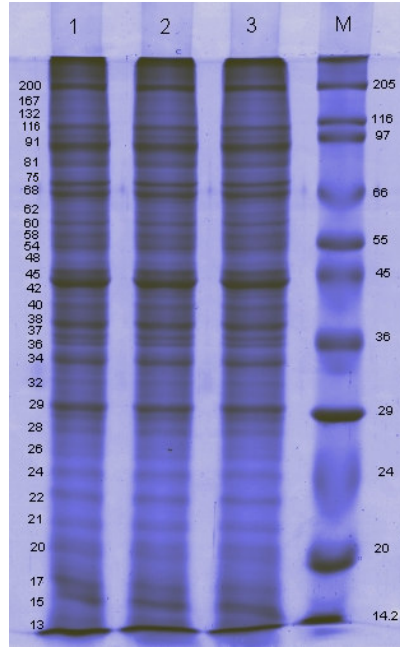
SDS-PAGE'de 7 adet koyun kist membranı kullanıldı. Koyun kist mebranlarında 219-8 kDa arasında 30 adet bant bulundu. Bu bantlar; 219, 199, 175, 148, 116, 102, 96, 87, 82, 75, 68, 58, 54, 48, 42, 40, 39, 38, 36, 30, 28, 27, 23, 22, 20, 19, 16, 14, 10 ve 8 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** Koyun kist membranı proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları 1-7 arası numaralar farklı hayvanlardan alınmış kist membranı örneklerini ifade etmektedir. M: Marker (Protein belirteci).

### 3.1.1.3. Koyunlara Ait Kist Protoskoleks Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi

SDS-PAGE'de 3 adet koyundan elde edilen protoskoleksler kullanıldı. Koyun protoskolekslerinde 200-8 kDa arasında 33 adet bant bulundu. Bu bantlar; 200, 167, 132, 116, 91, 81, 75, 68, 62, 60, 58, 54, 48, 45, 42, 40, 38, 37, 36, 34, 32, 29, 28, 26, 24, 22, 21, 20, 17, 15, 13, 10 ve 8 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.3).



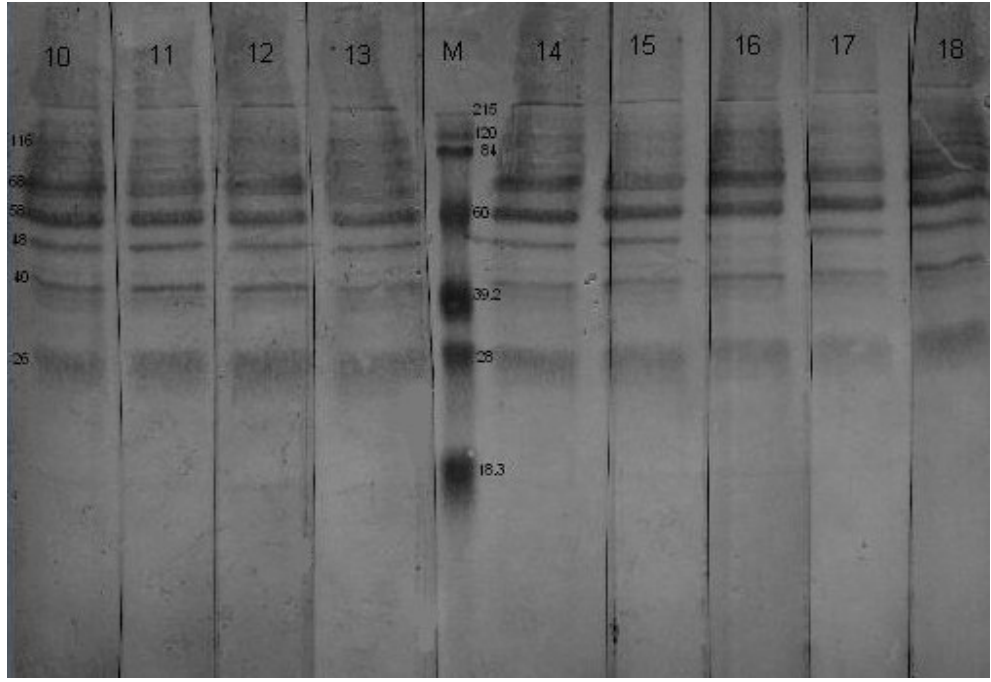
**Şekil 3.3.** Koyunlara ait protoskoleks proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları 1-3 arası numaralar farklı hayvanlardan alınmış protoskoleks örneklerini ifade etmektedir. M: Marker (Protein belirteci).

### 3.1.2. Koyunlarda Kist Hidatik Antijenik Proteinlerinin İmmunblotting ile Belirlenmesi

Koyun kist hidatik antijenik proteinlerin belirlenmesi amacıyla yapılan immunblot yönteminde membran marker'ı olarak 215-18.3 kDa arasında bantlar veren önceden proteinleri boyanmış (prestained) SDS-PAGE belirteci kullanıldı.

#### 3.1.2.1. Koyun Kist Sıvısındaki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi

İmmunblottingde 20 baş hasta koyun serumu kullanılarak 116-26 kDa arasında 6 bant tespit edildi. Bu bantlar; 116, 68, 58, 48, 40 ve 26 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.4).

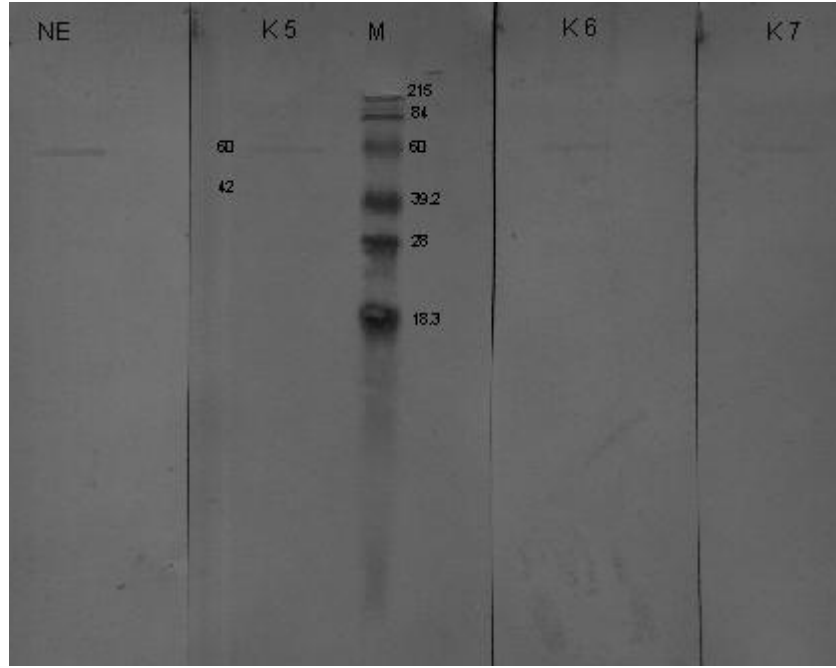


**Şekil 3.4.** Koyun kist sıvısında İmmunblotting ile pozitif koyun serumları kullanılarak elde edilen antijenik protein bantları. 12-20 numaralı bantlar farklı hasta hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilmiştir. M: Marker (Protein belirteci).

116 kDa'luk banta 18 hastada, 68 kDa'luk banta 18 hastada, 58 kDa'luk banta 20 hastada, 48 kDa'luk banta 19 hastada, 40 kDa'luk banta 20 hastada, 26 kDa'luk banta 20 hastada rastlanmıştır.

Kontrol serumlarının kullanıldığı immünblotting sonucunda 58 kDa luk banta 10 sağlıklı koyunda rastlanmıştır. Bu bant enfekte olmamış koyun serumunda da görülmüştür. (Şekil 3.5).

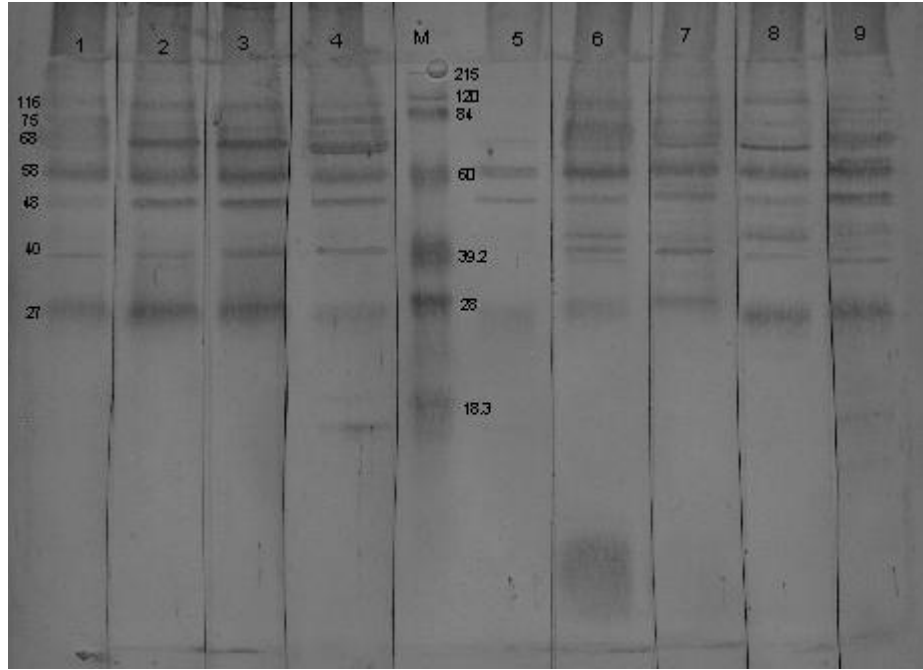
Bu sonuçlar doğrultusunda koyun kist sıvısındaki antijenik bantların 116, 68, 48, 40 ve 26 kDa olduğu görülmüştür.



**Şekil 3.5.** Koyun kist sıvısında immunblotting yöntemi ile negatif koyun serumlarında görülen spesifik olmayan bantlar. NE: enfekte olmamış serumla muamele edilmiş bant. K5-K6-K7: sağlıklı görünen hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilen bantlar. M: Marker (Protein belirteci).

### 3.1.2.2. Koyun Kist Membranındaki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi

Koyun kist membranındaki antijenik bantlar olarak immunblotting yöntemi ile 20 baş hasta koyun serumu kullanılarak 116-27 kDa arasında 7 adet bant tespit edildi. Bu bantlar; 116, 75, 68, 58, 48, 40 ve 27 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.6).

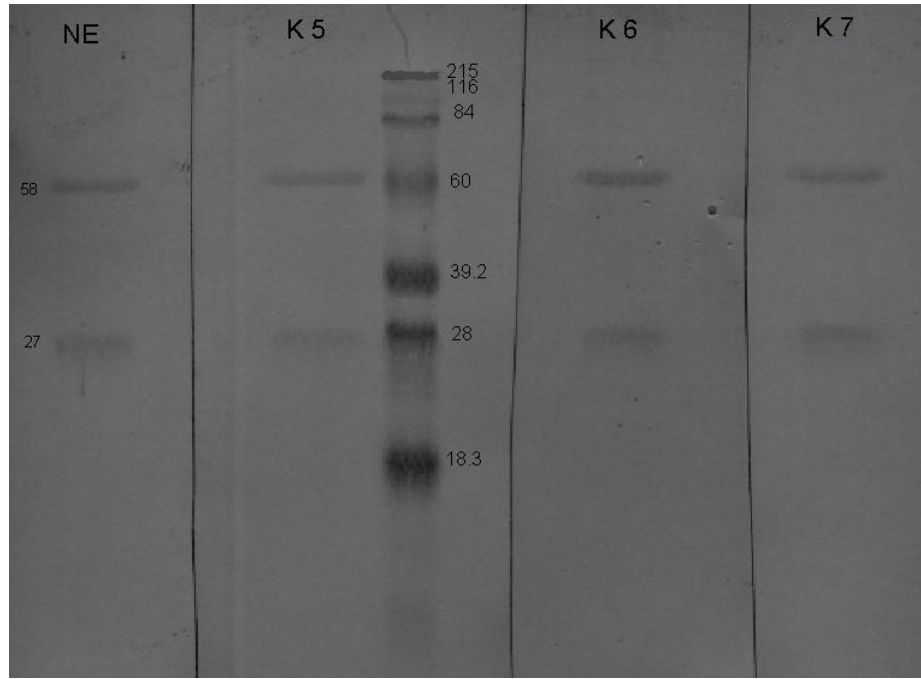


**Şekil 3.6.** Koyun kist membranında immunblotting ile pozitif koyun serumları kullanılarak elde edilen protein bantları. 1-9 numaralı bantlar farklı hasta hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilmiştir. M: Marker (Protein belirteci).

116 kDa'luk banta 18 hastada, 75 kDa'luk banta 19 hastada 68 kDa'luk banta 18 hastada, 58 kDa'luk banta 20 hastada, 48 kDa'luk banta 19 hastada, 40 kDa'luk banta 20 hastada, 27 kDa'luk banta 20 hastada rastlanmıştır.

Kontrol serumlarının kullanıldığı immunblotting sonucunda 58 ve 27 kDa luk bantlara 10 sağlıklı koyunda rastlanmıştır. Bu bantlar enfekte olmamış koyun serumunda da görülmüştür. (Şekil 3.7).

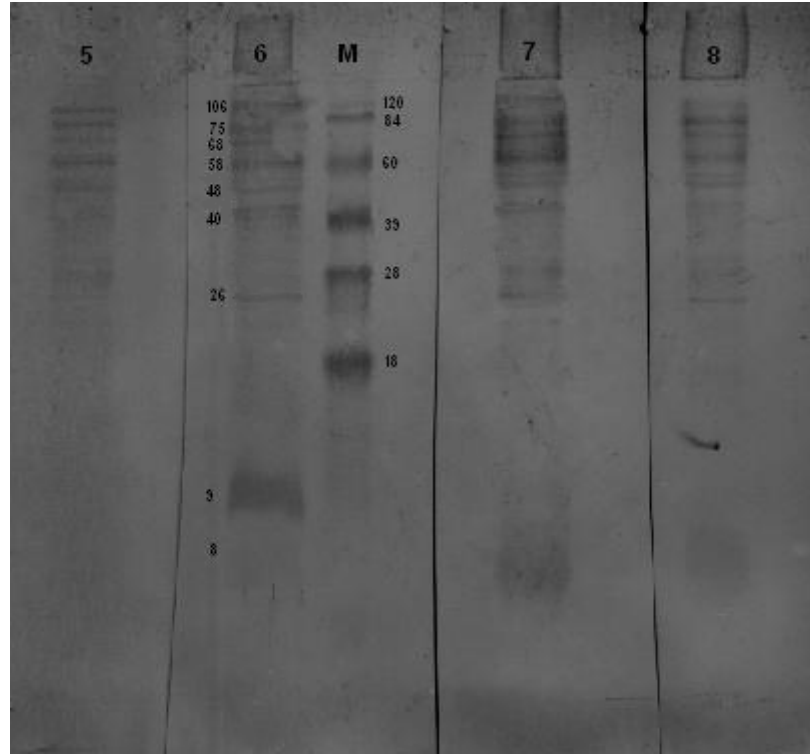
Bu sonuçlar doğrultusunda koyun kist membranındaki antijenik bantların 116, 75, 68, 48, 40 kDa olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 3.7.** Koyun kist membranında immunblotting yöntemi ile negatif koyun serumlarında görülen spesifik olmayan bantlar. NE: enfekte olmamış serumla muamele edilmiş bant. K5-K6-K7: sağlıklı görünen hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilen bantlar. M: Marker (Protein belirteci).

### 3.1.2.1. Koyun Protoskolekslerindeki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi

Koyun protoskolekslerindeki antijenik bantlar olarak İmmunblotting ile 20 baş koyun serumu kullanılarak 116-26 kDa arasında 8 bant tespit edildi. Bu bantlar; 116, 75, 68, 58, 48, 26, 9 ve 8 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.8).

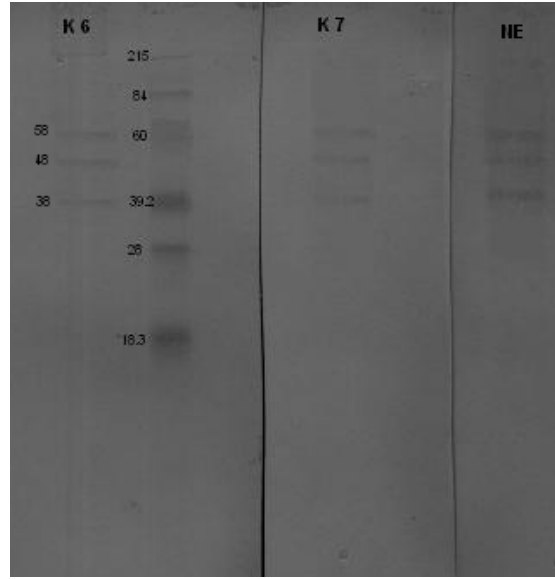


**Şekil 3.8.** Koyun protoskolekslerinde immunblotting yöntemi ile pozitif koyun serumlarında görülen bantlar. 5-8 numaralı bantlar farklı hasta hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilmiştir. M: Marker (Protein belirteci)

116 kDa'luk banta 18 hastada, 75 kDa'luk banta 19 hastada 68 kDa'luk banta 18 hastada, 58 kDa'luk banta 20 hastada, 48 kDa'luk banta 19 hastada, 40 kDa'luk banta 20 hastada, 26 kDa'luk banta 20 hastada, 9 kDa'luk banta 1 hastada, 8 kDa'luk banta 2 hastada rastlanmıştır.

Kontrol serumlarının kullanıldığı immunblotting sonucunda 58, 48 ve 38 kDa luk bantlara 10 sağlıklı koyunda rastlanmıştır. Bu bantlar enfekte olmamış koyun serumunda da görülmüştür. (Şekil 3.9).

Bu sonuçlar doğrultusunda antijenik bantların 116, 75, 68 ve 26 kDa olduğu düşünülmektedir.



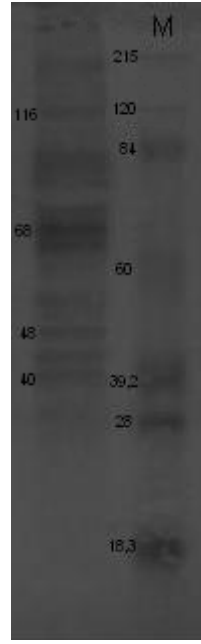
**Şekil 3.9.** Koyun protoskolekslerinde immunblotting yöntemi ile negatif koyun serumlarında görülen spesifik olmayan bantlar. K6-K7: sağlıklı görünen hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilen bantlar. NE: enfekte olmamış serumla muamele edilmiş bant. M: Marker (Protein belirteci).

### 3.1.3. Koyunlarda Kist Hidatik Proteinlerinde Glikoprotein Analizi

#### 3.1.3.1. Koyunlarda Kist Sıvısı Proteinlerinde Glikoprotein Analizi

##### Glikan Tayin Kiti ile Glikoprotein Analizi

Glikan tayin kiti kullanılarak ve üretici firmanın (Roche Diagnostik) direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilen bu yöntem sonucunda, antijenik proteinlerden 116, 68, 48 ve 40 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu belirlendi (Şekil 3.10).

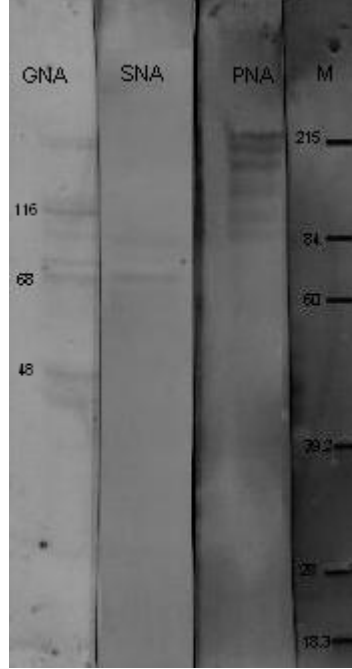


**Şekil 3.10.** Koyun kist sıvısında glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. M: Marker (Protein belirteci).

### **Glikan Ayırteci Kit ile Glikoprotein Analizi**

Kist Hidatik antijenik glikoproteinlerin şeker ve bağlantı tiplerinin belirlenmesi için Glikan ayırteci kiti (Glikan Diferensiasyon Kiti) kullanılarak yapılan bu yöntemde, üretici firmanın direktifleri uygulandı. Test sonucunda belirlenen glikoproteinlerin, MAA (Maackia amurensis agglutinin) sialik asit alfa (2-3) ile galaktoz arasında, GNA (Galanthus nivalis agglutinin) mannoz alfa (1-3), alfa(1-6) yada (1-2) ile mannoz arasında, SNA (Sambucus nigra agglutinin) sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz arasında, PNA (Peanut agglutinin) galaktoz beta (1-3) ile N-acetilgalaktozamin arasında), DSA (Datura stramonium agglutinin) (galaktoz beta (1-4) ile N-asetilgalaktozamin için spesifik lektinler kullanıldı.

Antijenik proteinlerden 116 kDa'luk glikoprotein GNA ve PNA lektini ile, 68 kDa'luk proteinin GNA ve SNA lektini ile, 48 kDa'luk proteinin GNA lektini ile bağlandığı görüldü (Şekil 3.11).



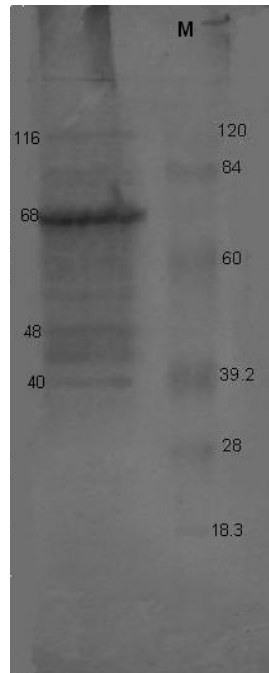
**Şekil 3.11.** Koyun kist sıvısında glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*): Mannoz, alfa (1-3), alfa(1-6) yada (1-2) ile mannoz; SNA (*Sambucus nigra agglutinin*): Sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz; PNA (*Peanut agglutinin*):Galaktoz beta (1-3) ile N-asetilgalaktozamin'e spesifik olarak bağlanan lektinlerdir..

Sonuç olarak koyun kist sıvısındaki 116 ve 68 kDa'luk proteinin mannoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdiği, 48 kDa'luk proteinin ise sadece mannoz içerdiği belirlendi.

### 3.1.3.2. Koyunlarda Kist Membranı Proteinlerinde Glikoprotein Analizi

#### Glikan Tayin Kiti ile Glikoprotein Analizi

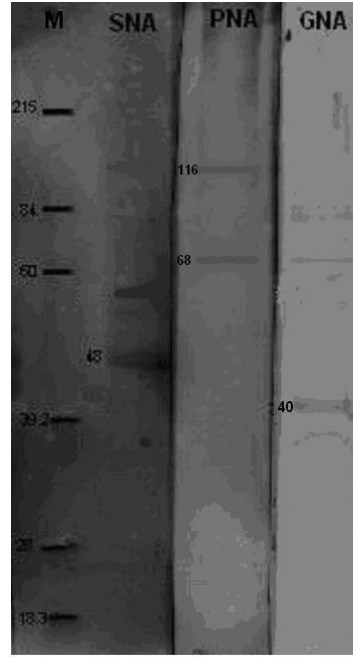
Glikan tayin kiti kullanılarak yapılan analiz sonucunda antijenik bantlardan 116, 68, 48 ve 40 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu belirlendi (Şekil 3.12).



**Şekil 3.12.** Koyun kist membranında glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. M: Marker (Protein belirteci).

#### Glikan Ayırteci Kiti ile Glikoprotein Analizi

Glikan tayin kiti kullanılarak yapılan analiz sonucunda antijenik bantlardan 116 kDa'luk bantın PNA lektini ile, 68 kDa'luk bantın PNA ve GNA lektini ile, 48 kDa'luk proteinin SNA lektini ile, 40 kDa'luk proteinin GNA lektini ile bağlandığı görüldü (Şekil 3.13).



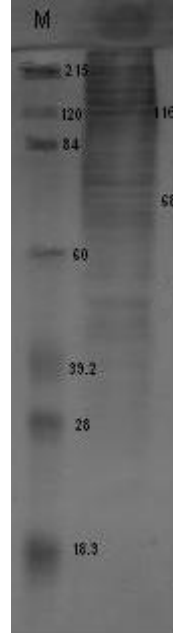
**Şekil 3.13.** Koyun kist mebranında glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. SNA (*Sambucus nigra agglutinin*): Sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz;GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*): Manno, alfa (1-3), alfa(1-6) yada (1-2) ile mannoz; PNA (*Peanut agglutinin*):Galaktoz beta (1-3) ile N-asetilgalaktozamin'e spesifik olarak bağlanan lektinlerdir.

Sonuç olarak, koyun kist membranındaki 116 kDa 'luk proteinin galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdği, 68 kDa'luk proteinin mannoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdği, 48 kDa'luk proteinin sialik asit ve galaktoz içerdği, 40 kDa'luk proteinin ise mannoz içerdği belirlendi.

### 3.1.3.3. Koyunlarda Protoskoleks Proteinlerinde Glikoprotein Analizi

#### Glikan Tayin Kiti ile Glikoprotein Analizi

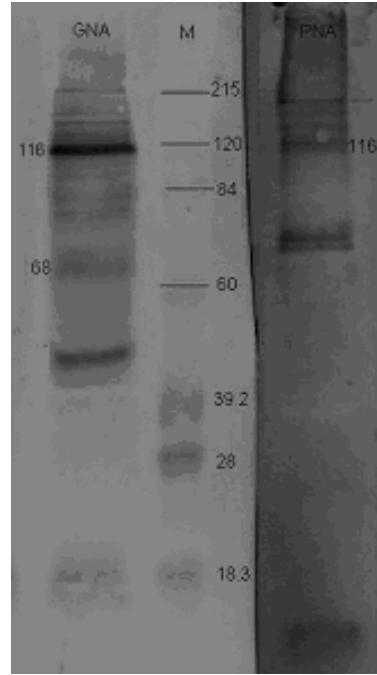
Glikan tayin kiti kullanılarak yapılan analiz sonucunda antijenik bantlardan 116 ve 68 kDa'luk proteinin glikoprotein olduğu belirlendi (Şekil 3.14).



**Şekil 3.14.** Koyun protoskoleksinde glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. M: Marker (Protein belirteci).

### **Glikan Ayırteci Kiti ile Glikoprotein Analizi**

Glikan tayin kiti kullanılarak yapılan analiz sonucunda antijenik bantlardan 116 kDa'luk proteinlerin GNA ve PNA lektini ile, 68 kDa'luk proteinin GNA lektiniyle bağlandığı görüldü (Şekil 3.15).



**Şekil 3.15.** Koyun protoskolekslerinde glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*): Mannoz, alfa (1-3), alfa(1-6) yada (1-2) ile mannoz'a; PNA (*Peanut agglutinin*):Galaktoz beta (1-3) ile N-asetilgalaktozamin'e spesifik olarak bağlanan lektinlerdir.

Sonuç olarak koyun protoskolekslerinde 116 kDa'luk proteinin mannoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdiği, 48 ve 68 kDa'luk proteinin sadece mannoz içerdiği belirlendi.

### 3.2. Farelerde Deneysel Olarak Geliştirilen Kist Hidatik'te Protein Profillerinin, Antijenik Proteinlerinin ve Glikoproteinlerin Belirlenmesi

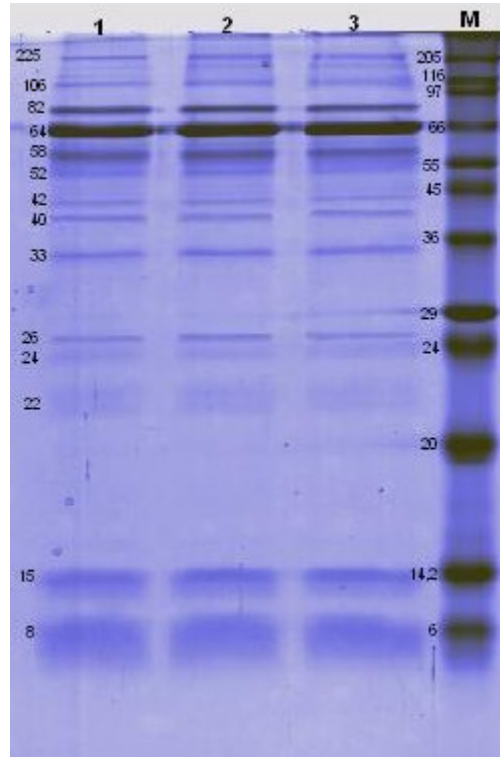
#### 3.2.1. Farelerde Kist Hidatik Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi

Protein profillerini belirlemek amacıyla fare kist sıvısı ve kist membranı örnekleri kullanılarak denatüre koşullarda ve kademeli jel sistemi ile vertikal poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. SDS- PAGE'de jel üzerinde 205-6.5

kDa (Sigma, S8445) arasında molekül ağırlığına sahip protein standartları kullanıldı.

### 3.2.1.1. Farelere Ait Kist Sıvısı Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi

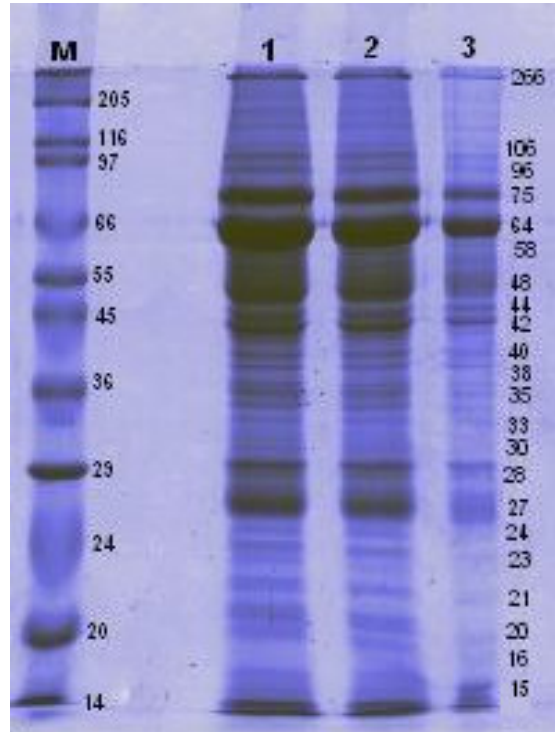
SDS-PAGE ile analiz için 3 adet fare kist sıvısı kullanıldı. Fare kist sıvılarında 225-8 kDa arasında 14 adet bant bulundu. Bu bantlar; 225, 106, 82, 64, 58, 52, 42, 40, 33, 26, 24, 22, 15 ve 8 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.16).



**Şekil 3.16.** Fare kist sıvısı antijenlerindeki proteinlerin SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları. 1,2,3 numaralar farklı hayvanlardan alınmış kist sıvısı örneklerini ifade etmektedir. M: Marker (Protein belirteci).

### 3.2.1.2 Farelere Ait Kist Membranı Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi

SDS-PAGE'de 3 adet fare kist membranı antijeni kullanıldı. Fare kist membranlarında 266-8 kDa arasında 22 adet bant bulundu. Bu bantlar; 266, 106, 96, 75, 64, 58, 48, 44, 42, 40, 38, 35, 33, 30, 28, 27, 24, 23, 21, 20, 16, 15 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.17).



**Şekil 3.17.** Fare kist membranı proteinlerinin SDS-PAGE ile ayrıştırılması sonucu elde edilen protein bantları. 1,2,3 numaralar farklı hayvanlardan alınmış kist sıvısı örneklerini ifade etmektedir. M: Marker (Protein belirteci).

### 3.2.2. Farelerde Kist Hidatik Antijenik Proteinlerinin İmmunblotting ile Belirlenmesi

#### 3.2.2.1 Fare Kist Sıvısındaki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi

İmmunblotting yöntemi ile 20 hasta fare serumu kullanılarak 106-8 kDa arasında 8 adet bant tespit edildi. Bu bantlar; 106, 64, 58, 40, 26, 22, 15 ve 8 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.18).

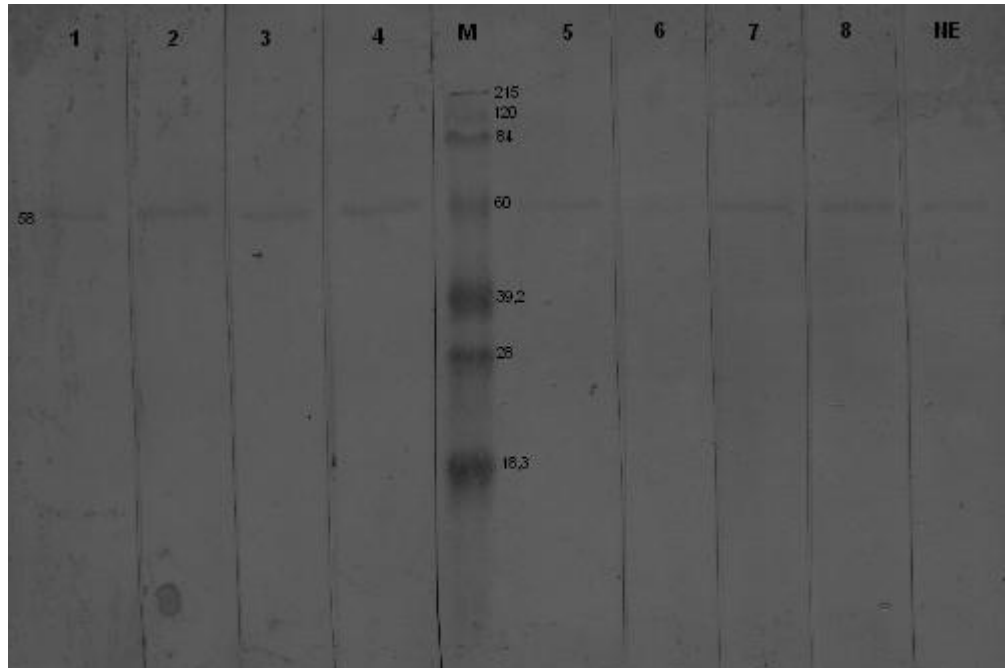


**Şekil 3.18.** Fare kist sıvısının İmmunblotting ile analizinde pozitif fare serumları kullanılarak elde edilen antijenik protein bantları. 13-19 numaralı fare kist sıvılarına ait bantlar farklı hasta hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilmiştir. M: Marker (Protein belirteci).

106 kDa'luk banta 18 hastada, 64 kDa'luk banta 19 hastada, 58 kDa'luk banta 18 hastada, 40 kDa'luk banta 20 hastada, 26 kDa'luk banta 20 hastada, 22 kDa'luk banta 19 hastada, 15 kDa'luk banta 18 hastada, 8 kDa'luk banta 19 hastada rastlanmıştır.

Kontrol serumlarının kullanıldığı immunblotting sonucunda 58 kDa luk banta 10 sağlıklı farede rastlandı. Bu bant enfekte olmamış fare serumunda da görüldü (Şekil 3.19).

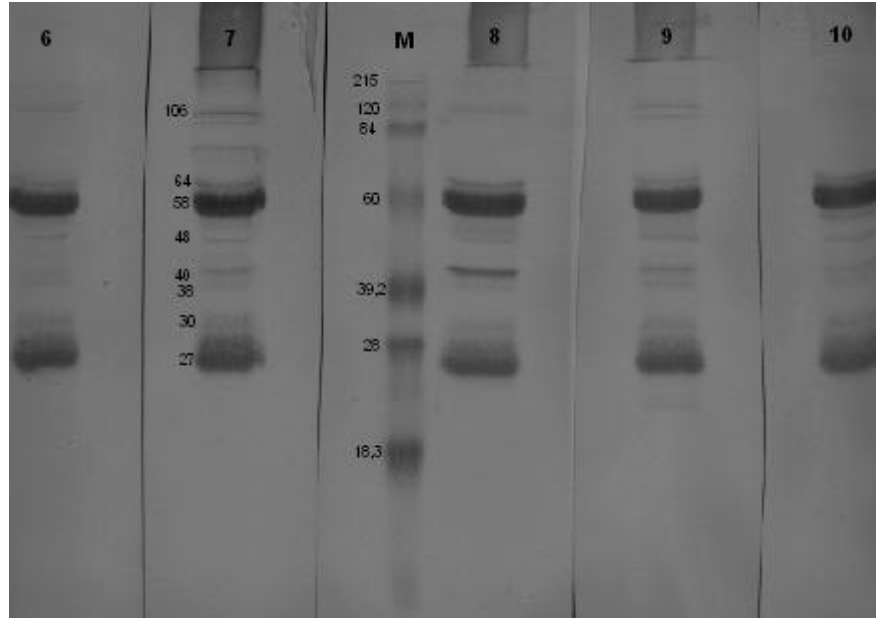
Bu sonuçlar doğrultusunda antijenik bantların 106, 64, 40, 26, 22, 15 ve 8 kDa büyüklüğünde olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 3.19.** Fare kist sıvısında immunblotting yöntemi ile negatif fare serumları kullanılarak elde edilen spesifik olmayan bantlar. 1-8 numaralı bantlar: sağlıklı görünen hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilen bantlar. NE: Nonenfekte serumla muamele edilmiş bant bantlar M: Marker (Protein belirteci).

### 3.2.2.2 Fare Kist Membranındaki Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi

İmmunblotting ile 20 hasta fare serumu kullanılarak 106-27 kDa arasında 8 bant tespit edildi. Bu bantlar; 106, 64, 58, 48, 40, 38, 30, 27 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.20).

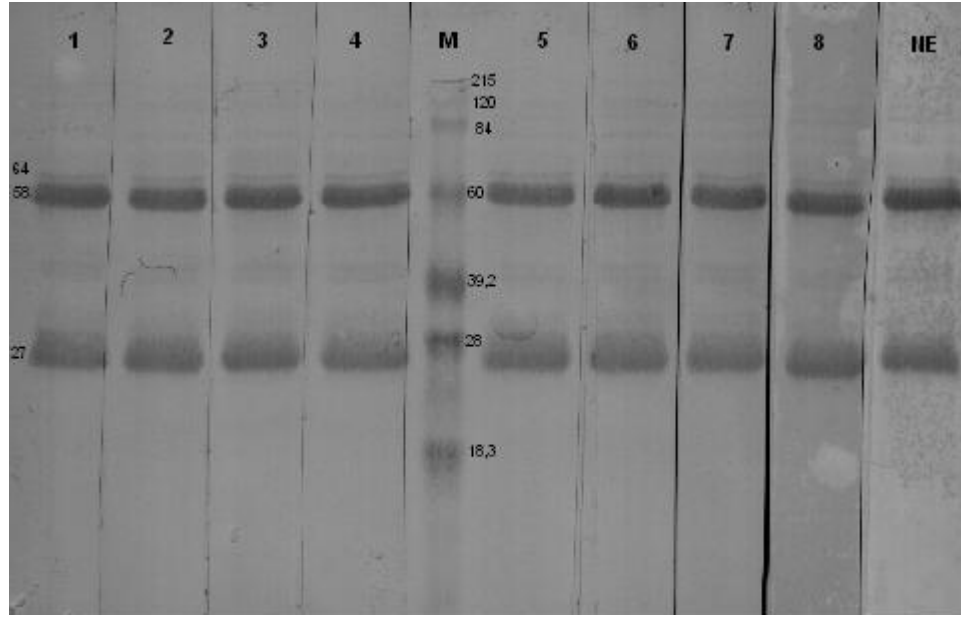


**Şekil 3.20.** Fare kist membranında İmmunblotting ile pozitif fare serumları kullanılarak elde edilen antijenik protein bantları. 6-10 numaralı bantlar farklı hasta hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilmiştir. M: Marker (Protein belirteci).

106 kDa'luk banta 18 hastada, 64 kDa'luk banta 20 hastada, 58 kDa'luk banta 20 hastada, 48 kDa'luk banta 20 hastada, 40 kDa'luk banta 20 hastada, 38 kDa'luk banta 20 hastada, 30 kDa'luk banta 19 hastada, 27 kDa'luk banta 20 hastada rastlandı.

Kontrol serumlarının kullanıldığı immünblotting sonucunda 64, 58 ve 27 kDa luk bantlara 10 sağlıklı koyunda rastlandı. Bu bantlar enfekte olmamış koyun serumunda da görüldü (Şekil 3.21).

Bu sonuçlar doğrultusunda antijenik bantların 106, 48, 40, 38 ve 30 kDa olduğu düşünülmektedir.



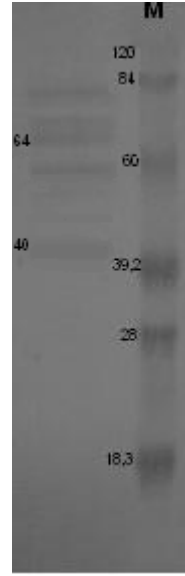
**Şekil 3.21.** Fare kist membranında immunblotting yöntemi ile negatif fare serumları kullanılarak elde edilen antijenik protein bantları. NE: enfekte olmamış serumla muamele edilmiş bantlar. 1-8 numaralı bantlar: sağlıklı görünen hayvanlardan alınmış serum örnekleriyle muamele edilen fare kist membranına ait bantlar. M: Marker (Protein belirteci).

### 3.2.3. Farelerde Kist Hidatik Proteinlerinde Glikoprotein Analizi

#### 3.2.3.1 Farelerde Kist Sıvısı Proteinlerinde Glikoprotein Analizi

##### Glikan Tayin Kiti ile Glikoprotein Analizi

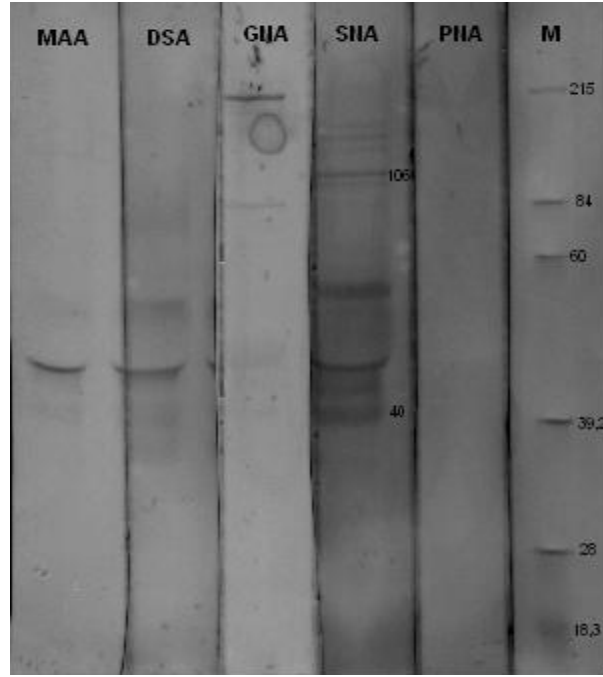
Glikan tayin kiti kullanılarak yapılan analiz sonucunda, antijenik proteinler içerisinde 64 ve 40 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu belirlendi (Şekil 3.22).



**Şekil 3.22.** Fare kist sıvısında glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. M: Marker (Protein belirteci).

### **Glikan Ayırteci Kiti ile Glikoprotein Analizi**

Glikan tayin kiti kullanılarak yapılan analiz sonucunda antijenik proteinlerden 106 ve 40 kDa'luk glikoproteinlerin SNA lektini ile bağlandığı görüldü (Şekil 3.23).



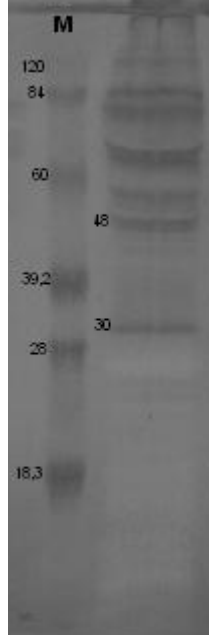
**Şekil 3.23.** Fare kist sıvısında glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. MAA (*Maackia amurensis agglutinin*): Sialik asit alfa (2-3), galaktoz; DSA (*Datura stramonium agglutinin*): Galaktoz beta (1-4) ile N-asetilgalaktozamin.GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*): Mannoz, alfa (1-3), alfa(1-6) yada (1-2) ile mannoz; SNA (*Sambucus nigra agglutinin*): Sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz; PNA (*Peanut agglutinin*):Galaktoz beta (1-3) ile N-asetilgalaktozamin'e spesifik olarak bağlanan lektinlerdir.

Sonuç olarak fare kist sıvısındaki antijenik proteinlerden 106 ve 40 kDa'luk proteinlerin sialik asit ve galaktoz içerdiği belirlendi.

### 3.2.3.2. Farelerde Kist Membranı Proteinlerinde Glikoprotein Analizi

#### Glikan Tayin Kiti ile Glikoprotein Analizi

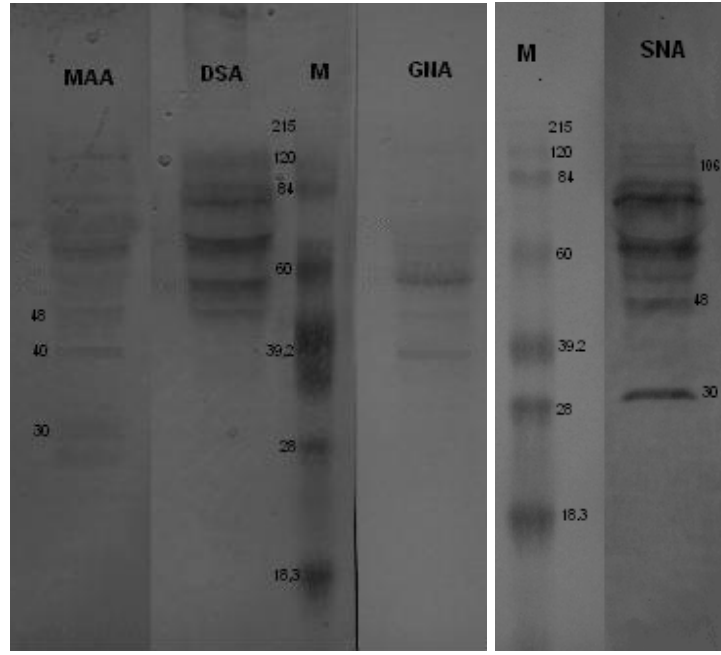
Glikan tayin kiti kullanılarak yapılan analizler sonucunda, antijenik proteinler içerisinde 48 ve 30 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu belirlendi (Şekil 3.24).



**Şekil 3.24.** Fare kist membranında glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. M: Marker (Protein belirteci).

### **Glikan Ayırteci Kiti ile Glikoprotein Analizi**

Glikan tayin kiti kullanılarak yapılan analiz sonucunda 106 kDa'luk proteinin SNA lektini ile, 48 kDa'luk glikoproteininin MAA, DSA, GNA ve SNA lektini ile, 40 kDa'luk proteininin MAA ve GNA lektini ile, 30 kDa'luk proteininin MAA ve SNA lektini ile bağlandığı görüldü (Şekil 3.25).



**Şekil 3.25.** Fare kist membranında glikan ayırteci kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. MAA (*Maackia amurensis agglutinin*): Sialik asit alfa (2-3), galaktoz; DSA (*Datura stramonium agglutinin*): Galaktoz beta (1-4) ile N-asetilgalaktozamin.GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*): Mannoz, alfa (1-3), alfa(1-6) yada (1-2) ile mannoz; SNA (*Sambucus nigra agglutinin*): Sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz'a bağlanan lektinlerdir. M: Marker (Protein belirteci).

Sonuç olarak 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.



#### 4. TARTIŞMA

Hidatik kistin serolojik tanısında, koyun kökenli kistlerden elde edilen antijenler, sığır ve insan kökenlilere göre daha hassas sonuçlar verirken (Karaman ve ark., 2002) diğer paraziter enfeksiyonlarla daha az çapraz reaksiyon vermekte ve Echinococcus türüne ait tüm özgün fraksiyonları içermektedir (Leggatt ve ark., 1992). 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 materyalin koyun kökenli doğal enfekte kist hidatik materyalleri ile uyumluluğu protein profilleri açısından karşılaştırılarak araştırılmıştır.

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 edilmiş ve bu antijenik proteinlerden glikoprotein yapısında olanlar araştırılmıştır. Çalışmanın tamamının örneği olmamakla birlikte bazı bölümlerinin yerli ve yabancı araştırmacılar tarafından da yapıldığı gözlenmiştir. Özellikle antijenik proteinlerde glikoprotein analizleri Türkiye’de ilk defa bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada koyun ve fare kist materyalleri antijenik proteinler yönünden incelenmiş ve koyun kist hidatik sıvısında; 116, 68, 58, 48, 40 ve 26 kDa’luk proteinlerin antikor yanıt verdiği fakat 58 kDa’luk bantın kontrollerde de çıktığı, kist membranında; 116, 75, 68, 58, 48, 40, 27 kDa’luk proteinlerin antikor yanıt verdiği ancak 58 ve 27 kDa’luk bantların kontrollerde de çıktığı, protoskolekslerde; 116, 75, 68, 58, 48, 40 ve 26

kDa'luk proteinlere antikor yanıt verdiği fakat 58, 48 ve 40 kDa'luk bantlara kontrollerde de rastlandığı tespit edilmiştir. Koyun, keçi ve domuz kist sıvısında 116, 58, 45, 38, 24, 16 ve 8 kDa'luk proteinlere karşı antikor yanıt elde eden Kanwar ve ark. (1992), 58, 45, 38, 24 ve 16 kDa'luk proteinleri bütün hidatidozisli serumlarda görmüş ancak bu bantlara sistiserkosisli, diğer paraziter enfeksiyonlu, viral hepatitisli hayvanlarla birlikte sağlıklı kontrollerde de rastladıklarını bildirmişlerdir. 8 ve 116 kDa'luk bantlar ise tüm hidatidozlu serumlarda görülürken, diğerlerinde rastlanmamıştır. Kanwar ve Vinayak (1993) yaptıkları çalışmada moleküler ağırlıkları 116 ve 8 kDa olan bu hidatik spesifik proteinleri affinite kromatografisi kullanarak kist sıvısından başarıyla izole etmişlerdir. Koyun karaciğer hidatik kist sıvısı kullanarak, iki yönlü pürifikasyon yöntemi ile 8 kDa'luk antijeni pürifiye eden Sarımeahmetoğlu ve ark. (1998), bu proteinin serolojik testlerde spesifik antijen olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. 116 kDa'luk antijenin birbirine disülfid bağlarla bağlı 45, 66, 75, 116 kDa'luk alt üniteleri olan heterotetramer yapıda olduğunu bildirilirken 8 kDa'luk proteinin monomer peptit olduğu kaydedilmiştir. Irabuena ve ark. (2000) fertil ve steril sığır kist hidatik sıvılarını karşılaştırmışlar; total ve konak kökenli proteinler arasında fark gözlemezken karbonhidrat ve lipit içerikli proteinleri fertil kist sıvılarında daha yüksek bulmuşlardır. Western Blotting yöntemiyle fertil kist sıvılarında 116, 50, 38, 26, 16, steril kist sıvılarında 50, 26 ve 16, sağlıklı kontrollerde ise 50 ve 26 kDa'luk protein bantlarına rastlanmıştır. 116 ve 38 kDa'luk proteinlerin yalnızca fertil kist sıvılarında bulunduğu sonucuna varılmıştır. İnsan, koyun ve sığır kökenli kist hidatik sıvılarında proteinlerin SDS-PAGE ile analizlerinde 8-120 kDa arasında değişen 20 kadar bant bulan Köksal ve ark. (1995), 116, 98, 68, 57 ve 45 kDa'luk en az 5 banta karşı antikor cevabı tespit etmişlerdir. 8 kDa'luk proteini nitroselüloz membranda göstere-memelerini küçük olan bu proteinin elektrik akımının etkisiyle membran porlarından geçmiş olabileceğine bağlamışlardır. Şaşmaz ve ark. (1995), insan kökenli hidatik kistin protoskoleks, kist sıvısı ve çimlenme zarını kullanarak bunlara ilişkin antijenik profilleri Western Blot ile ortaya çıkarmışlar ve 68, 57, 45, 20, 8 kDa'luk antijenik determinantları tespit

ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı zamanda sığır ve koyun kökenli kist sıvılarından da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Burgu ve ark. (2000) SDS-PAGE ve Western blotting yöntemlerini kullanarak koyun karaciğer kist hidatik sıvısı protein bantlarını ortaya çıkarmışlar, koyun ve insanlar için spesifik protein bantlarını belirlemişlerdir. Western blotting sonunda koyun kist sıvısında 200, 116, 98, 68, 58, 38, 24, 16 ve 8 kDa'luk 9 bant elde etmişler ve koyun kist hidatik hastalığı için spesifik protein bantının 116 kDa, insan kist hidatik hastalığı için spesifik protein bantlarının 68 ve 8 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Değişik pürifikasyon metodları kullanarak koyun kist hidatik sıvısı ve protoskoleks antijenlerinin verdiği antikor yanıtı inceleyen Sbihi ve ark. (1996) yaptıkları bu çalışmada; protoskolekslerde 110, 66, 42 ve 37 kDa'luk bantlara karşı antikor yanıt elde etmişler, 110 kDa'luk bantın Kanwar ve ark.'nın (1992) bulduğu 116 kDa'luk bant olabileceğini ancak bu bantı 20 hasta serumundan sadece 6'sında gösterebildiklerini belirtmişlerdir. Diğer yandan 37 kDa'luk bantı bütün hasta serumlarında görmelerine rağmen sağlıklı kontrollerin pek çoğunda da gördüklerini bildirmişlerdir. Bant 42'yi 20 pozitif serumun 16'sında gösterirken, bu banta 20 negatif serumun 4'ünde de rastlamışlardır. Kist sıvısında 110, 66, 42, 37, 34, 20, 12-14 kDa'luk bantlara karşı antikor yanıt elde etmişlerdir. 37, 42 ve 110 kDa'luk bantlar bütün serumlarda görülürken pek çok kontrol serumuyla da çapraz reaksiyon vermiştir. 12-14 ve 34 kDa'luk bantların spesifitesinin yüksek, sensivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmalara bu açıdan bakıldığında koyun kist hidatik sıvısında bulduğumuz 116 kDa'luk antijenik banta Kanwar ve ark. (1992), Irabuena ve ark. (2000), Burgu ve ark. (2000), Köksal ve ark. (1995) da rastlamışlardır. Bunun yanında Shibi ve ark. (1996)'nın bulduğu 110 kDa'luk bantın aynı bant olabileceği düşünülmektedir. Aynı araştırmacılar bu bantın spesifik olduğunu da belirtmişlerdir.

Bulduğumuz 68 kDa'luk bantın Burgu ve ark.(2000), Köksal ve ark. (1995) da antijenik olduğunu belirtmişlerdir. Shibi ve ark.(1996) nın belirttiği 66 kDa'luk bantın da bu bantla aynı olabileceği düşünülmektedir.

Antijenik özellik gösteren fakat kontrol ve enfekte olmamış serumlarla da bant veren ve tarafımızdan konak proteini olabileceği düşünülen 58 kDa'luk banta Kanwar ve ark.(1995), Burgu ve ark. (2000) da antikor yanıt veren bantlar içinde rastlamışlardır. Köksal ve ark. (1995) nın bulunduğu 57 kDa luk bantın da aynı bant olabileceği düşünülmektedir. Bu araştırmacılar, bizim çalışmamızda olduğu gibi bu bantları kontrol serumlarda da gördükleri için spesifik grup içinde gösterememişlerdir.

Çalışmamızda antijenik bantlar içinde tespit ettiğimiz 48 kDa'luk bantı Al-Yaman ve Knobloch (1989) da spesifik olarak göstermişlerdir. Al-Yaman ve Knobloch (1989) koyun hidatik kist sıvısından hidrofobik etkileşimli kromatografi, anyon değişimli kromatografi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanarak 20 ve 48 kDa ağırlığında, glikoprotein yapısında iki parazit antijeni izole etmişlerdir. Her iki antijende heterolog parazitik enfeksiyon taşıyan hasta serumlarıyla test edildiğinde sadece Eg20'nin *E. granulosus* için spesifik olduğu, Eg48 antijeninin ise %33 oranında *E. multilocularis* li hasta serumlarıyla çapraz reaksiyon verdiği bildirilmiştir. Eg48 antijeninin hidatik kist sıvısında bol olmasından dolayı özellikle *E. granulosus* için, endemik bölgelerde hastalığın teşhisi için yararlı ve pratik olabileceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte Kanwar ve ark. (1995), Köksal ve ark. (1995)'nin bulunduğu 45 kDa'luk bantların da aynı bantlar olabileceği düşünülebilir.

Antijenik bant olarak tespit ettiğimiz 40 kDa'luk bantın Kanwar ve ark. (1995), Irebuena ve ark. (2000), Burgu ve ark. (2000)'nin bulunduğu 38 kDa'luk bantla, Shibi ve ark. (1996)'nin bulunduğu 37 kDaluk bantla aynı olabileceği

düşünmekteyiz. Irebuena ve ark. (2000), 38 kDa'luk bu bantın spesifik olduğunu belirtmişlerdir.

Bulduğumuz 26 kDa'luk antijenik bantı Irabuena ve ark.(2000) da tespit etmişlerdir. Kanwar ve ark. (1995), Burgu ve ark. (2000)'nın bulunduğu 24 kDa'luk bantın da aynı bant olabileceği düşünülebilir.

Sonuçlarımız dışında bulunan 200 kDa'luk bantı Burgu ve ark. (2000), 98 kDa'luk bantı Burgu ve ark. (2000), Köksal ve ark. (1995), 16 kDa'luk bantı ise Kanwar ve ark.(1995), Irebuena ve ark. (2000) ile Burgu ve ark. (2000) antijenik olarak göstermişlerdir. Bunun yanında 20 kDa'luk bantı Al-Yaman ve Knobloch (1989), Shibi ve ark. (1996), 12-14 kDa'luk bantı Shibi (1996), 8 kDa'luk bantı ise Maddison ve ark. (1989), Kanwar ve ark. (1995), Burgu ve ark. (2000) spesifik olarak göstermişlerdir. Deve, koyun, fare ve insan kökenli kist hidatik sıvılarını kullanarak yaklaşık molekül ağırlığı 8 kDa olan ve diagnostik açıdan önemli olan bir ekinokok antijeni tanımlayan Maddison ve ark. (1989), bu antijenin sensitivitesinin %81, spesifitesinin %100 olduğunu belirtmişlerdir.

Çoğu araştırmacı tarafından spesifik kabul edilen ancak ulaşabildiğimiz literatürlerin bir kısmında göremediğimiz 116 kDa'luk bantın Irebuena ve ark. (2000)'nin yaptığı çalışmayla uyumlu olarak, kullanılan hidatik kistlerdeki protoskoleks varlığı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Kist membranının antijenik proteinleriyle ilgili ulaşabildiğimiz tek literatür olan Gonzalez ve ark. (2000) 'nın yaptığı çalışmada kist membranından 29 kDa'luk yeni bir antijen karakterize etmişlerdir. 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 karakter gösteren, enfekte olmamış ve kontrol serumlarla bant vermeyen proteinler, yapılan çalışmalarda bulunan proteinlerle karşılaştırıldığında antijenik bulduğumuz 68 kDa'luk bantın Doğanay ve ark. (2000) tarafından antijenik ve spesifik bulunduğu görülmektedir. Doğanay ve ark. (2000) SDS-PAGE yöntemi ile kist hidatik protoskolekslerinin protein bantlarını ortaya çıkarmışlar, Western Blot yöntemi ile pozitif koyun serumlarında 68, 58, 48, 38, 24 ve 8 kDa'luk bantlar elde etmişler ve koyunlar için kist hidatik spesifik protein bantlarının 68, 24 ve 8 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda Shibi ve ark. (1996)'nın bulduğu 66 kDa'luk antijenik bantın da aynı bant olabileceği düşünülmektedir. Yine bulduğumuz 26 kDa'luk bantın Doğanay ve ark. (2000)'nın antijenik ve spesifik olarak bulduğu 24 kDa'luk bantla aynı bant olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı araştırmacılar tarafından spesifik ve antijenik olarak gösterilen 8 kDa'luk banta 20 hasta serumundan sadece 2'sinde rastlayabildik. Antijenik olarak bulduğumuz ancak kontrol ve nonenfekte serumlarla da bant veren 58, 48 ve 40 kDa'luk bantların Doğanay ve ark. (2000) tarafından bulunan ve spesifik bantlar içinde gösterilmeyen 58, 48 ve 38 kDa'luk bantlarla aynı olduğu düşünülmektedir.

Kist Hidatik proteinlerinde glikoprotein varlığına ilişkin çalışmalar oldukça sınırlı sayıda olup, bizim çalışmamızla bire bir paralellik arzeden bir literatüre rastlanmamıştır.

Bulduğumuz koyun kist sıvısı antijenik bantları içinde kist sıvısında 116, 68, 48 ve 40 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu ve 116kDa'luk proteinin GNA ve PNA lektini ile, 68 kDa'luk proteinin GNA ve SNA lektini ile, 48 kDa'luk proteinin GNA lektini ile bağlandığı, kist membranında 116, 68, 48 ve 40 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu, 116 kDa'luk proteinin PNA lektini ile, 68 kDa'luk proteinin GNA ve PNA lektini ile, 48 kDa'luk proteinin SNA lektini ile, 40 kDa'luk proteinin GNA lektini ile bağlandığı,

protoskolekslerde 116 ve 68 kDa'luk proteinin glikoprotein olduğu, ve 116 kDa'luk proteinin GNA ve PNA lektini ile, 68 kDa'luk proteinin GNA lektini ile bağlandığı görüldü. Kist sıvısı, kist membranı ve protoskolekslere glikoprotein açısından genel anlamda baktığımızda, 116 ve 68 kDa'luk proteinlerin kist sıvısı, kist membranı ve protoskolekslerde ortak olduğu, 48 ve 40 kDa'luk bantların ise kist sıvısı ve kist membranında ortak olduğu görülmüştür.

Koyun kist sıvısındaki 116 ve 68 kDa'luk proteinin mannoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdđiđi, 48 kDa'luk proteinin ise sadece mannoz içerdđiđi, koyun kist membranındaki 116 kDa 'luk proteinin galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdđiđi, 68 kDa'luk proteinin mannoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdđiđi, 48 kDa'luk proteinin sialik asit ve galaktoz içerdđiđi, 40 kDa'luk proteinin ise mannoz içerdđiđi, koyun protoskolekslerinde 116 kDa'luk proteinin mannoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamin içerdđiđi, 48 ve 68 kDa'luk proteinin sadece mannoz içerdđiđi belirlendi. Bu açıdan bakıldığında 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 (1989)'un koyun kist sıvısında Eg 48 olarak tanımladıkları glikoprotein yapısındaki antijenin yaptığımız çalışmada kist sıvısı ve kist membranında gösterdiğimiz 48 kDa'luk bantla aynı olabileceğini düşünmekteyiz.

Khoo ve ark.(1997)'nın kist membranında bildirdiği yüksek mannoz yapıları 40 ve 68 kDa'luk proteinlerin GNA lektiniyle bağlandığını göstererek, sialik asit içeren N-glikanları da 48 KDa'luk proteinin SNA lektiniyle bağlandığını göstererek doğruladık. Protoskolekslerde ise SNA ve 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. İncelenen kist sıvısı ve membran yapılarında protein profilleri belirlenerek antijenik proteinlerden hangilerinin glikoprotein yapısında oldukları belirlenmiştir.

Fare kist hidatik sıvısında 106, 64, 58, 40, 26, 22, 15 ve 8 kDa'lık bantlar antijenik karakter göstermiş, bunlardan 58 kDa'luk bant kontrol ve enfekte olmamış serumlarda da izlenmiştir.

Fare kist hidatik membranının incelenmesinde 106, 64, 58, 48, 40, 38, 30 ve 27 kDa'luk bantlara rastlanmış, bunlardan 64,58 ve 27 kDa'luk bantlar kontrol ve nonenfekte serumlarla da görülmüştür.

Maddison ve ark. (1989)'nın deve, koyun,fare ve insan kökenli hidatik kist sıvılarından purifiye ettikleri ve diagnostik açıdan önemli buldukları 8 kDa'luk proteine fare kist hidatik sıvılarının incelenmesinde biz de rastladık.

Gerek fare kist hidatik sıvısı gerekse fare hidatik kist membranında antijenik karakterde bulduğumuz protein bantlarının glikoprotein bakımından incelenmesinde kist sıvısında 106, 64 ve 40 kDa'luk bantların glikoprotein olduğu 106 ve 40 kDa'luk proteinlerin SNA lektiniyle bağlandığı, kist membranında 106, 48, 40 ve 30 kDa'luk proteinlerin glikoprotein olduğu, 106 kDa'luk proteinin SNA lektini ile 48 kDa'luk proteinin MAA, DSA, GNA ve SNA lektini ile, 30 kDa'luk proteinin ise MAA ve SNA lektini ile bağlandığı görülmüştür.

Fare kist sıvısı ve fare kist membranında tespit edilen proteinlerden 106 ve 40 kDa olanların ortak olduğu görülmüştür. 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.

Fare kist sıvısındaki antijenik proteinlerden 106 ve 40 kDa'luk proteinin 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. Fare kist sıvısındaki 48 kDa'luk protein de aynı şekerleri içermesine rağmen antijenik olmadığı için değerlendirilmedi. Koyunlarda olduğu gibi farelerde de kist hidatik materyallerinin şeker içerikleri, 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. Koyun kist sıvısı ve fare kist sıvısı arasındaki ortak antijenik bantlara baktığımızda fare kist sıvısında bulunan 40 kDa'luk bantın sialik asit, galaktoz ve mannoz içerdiğini gözlemlerken, koyun kist sıvısında bu bantın glikoprotein olduğunu glikan tayin kiti ile tespit etmemize rağmen, lektinlerden hiç birisiyle bağlanma vermediği için şeker içeriklerini tespit edemedik. Ayrıca, 26 kDa'luk ortak antijenik bantlar elimizde bulunan hiçbir lektinle bağlanma göstermedi. Koyun kist membranı ile fare kist membranı arasındaki ortak antijenik bantlara baktığımızda 48 kDa'luk bant koyun kist membranında sialik asit ve galaktoz içerirken, fare kist membranında bunlara ilaveten N-asetil galaktozamin ve mannoz içermektedir. Buna benzer bir şekilde 40 kDa'luk protein fare kist sıvısında sialik asit ve galaktoz bulundururken fare kist membranında buna ilaveten mannoz da

bulundurmaktadır. Bundan başka kist materyalleri aynı şekerleri içeriyor olsa da bağlandıkları lektinlerin farklı olması nedeniyle bağlanma bölgeleri açısından da farklılıklar göstermektedir.

Doğal enfekte koyunlarla deneysel enfekte fareler arasında ortak antijenik proteinler bulmamız başta, ileri düzeydeki moleküler çalışmalarda farelerin koyunlar yerine kullanılabilirliği açısından ümit verici olsa da antijenik proteinler ve glikoproteinler arasında gözlenen farklılıklar, aşı çalışmalarında fareleri koyunlar yerine güvenle kullanamayacağımıza işaret etmektedir.

Gerek diğer paraziter enfeksiyonlarla oluşan çapraz reaksiyonlar gerekse konak antijen ve antikorlarının sebep olduğu yanlış negatif yada pozitiflikler, hastalığın serolojik tanısında ya da bu araştırmalar sırasında karşılaşılan zorluklardandır. Bir diğer zorluk ise parazit larva döneminin dış yüzeyine yer yer koyduğu fosforilkolin molekülleri sayesinde kendi antijenik yapısını konakçıdan saklayarak düşük affiniteli antikor oluşumuna neden olmasıdır (Shepherd ve Mc. Manus, 1987).

Siracusano ve ark. (1991) spesifitede görülen farklılıkların antijen hazırlama şekline ve popülasyonlardaki çevresel faktörlere bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

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 kanaatine varılmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın önemli amaçlarından biri olan, doğal enfekte koyunlarda ve deneysel enfekte farelerde oluşan kist materyallerinin protein düzeyinde karşılaştırılması, antijenik bantlar ve glikoprotein özelliğinde olan proteinler yönünden yapılmıştır. Buna göre kist sıvısında görülen 40 ve 26 kDa'luk bantların koyun ve farelerde ortak olduğu ve 40 kDa'luk bantın her iki konakta da glikoprotein özelliği gösterdiği görülmüştür. Koyun ve farelerin kist membranları karşılaştırıldığında 48 ve 40 kDa'luk proteinlerin ortak olduğu, bunların her ikisinin de glikoprotein özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Kist sıvısı ve kist membranı açısından yapılan karşılaştırmada ortak bantların (molekül büyüklüğü ve glikoprotein varlığı), bağlandıkları lektinler yönünden farklılıklar arz etmesi ki bu durum şeker yapılarındaki ayrılığa işaret etmektedir. Bu sonuçlar farelerin koyunlar yerine kullanılmayacağını gösteriyor olsa bile, yakın gelecekte ileri düzeydeki moleküler tekniklerle (proteomik, kütle spektrometrik ve kromatografik vb.) yapılacak olan çalışmalarla antijenik yapıdaki glikoproteinlerin yapısal ve fonksiyonel yönden daha ileri bir şekilde karakterize edilmelerine ihtiyaç vardır.

Koyunlarda her üç kist materyalinde de (kist sıvısı, kist membranı, protoskoleks) 116, 68, 48 kDa'luk proteinlerin, farelerde her iki kist materyalinde (kist sıvısı, kist membranı) 106, 48 ve 40 kDa'luk proteinlerin ortak glikoproteinler olduğu, bu glikoproteinlerin mannoz, galaktoz, N-asetil galaktozamin, sialik asit gibi şekerlerden bir yada bir kaçını içerdikleri belirlenmiştir. Belirlenen bu antijenik proteinlerin kist hidatiğin klinik tanısında ve aşı çalışmalarında faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır.

## ÖZET

### **Koyun ve Farelerde Kist Hidatik Proteinlerinin Karşılaştırmalı Analizi ve Antijenik Proteinlerde Glikoprotein Varlığının Değerlendirilmesi**

Hidatik kist hastalığı, *Echinococcus* cinsine bağlı türler tarafından oluşturulan, insan ve hayvan sağlığına verdiği önemli zararların yanı sıra sebep olduğu ekonomik kayıplar nedeniyle de güncelliğini ve önemini koruyan paraziter bir zoonotik hastalıktır.

Bu çalışmada koyun ve farelerde kist hidatik proteinlerinin, antijenik proteinler ve antijenik glikoproteinler yönünden karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 20'şer adet enfekte ve 10'ar adet sağlıklı koyun ve fare kullanıldı. Hidatidosisli koyunlardan ve deneysel enfekte farelerden elde edilen kist sıvısı, kist membranı ve protoskolekslere ait proteinler SDS-PAGE yöntemi ile ayırt edildi. Ayırt edilen proteinlerden hangilerinin hastalığa spesifik antijenler içerdiği (hastalık pozitif serumlar kullanılarak) 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 ve 26 kDa, koyun kist membranı ile fare kist membranı arasındaki ortak antijenik bantların 48 ve 40 kDa olduğu belirlendi. Belirlenen antijenik proteinlerden, glikoprotein yapı-sında olanlar ve bunların hangi şekerleri bulduklarını "Dig-Glycan Detection ve Dig-Glycan Differentiation kitleri" ile belirlenmiştir. Koyunlarda her üç kist materyalinde de (kist sıvısı, kist membranı, protoskoleks) 116, 68, 48 kDa'luk proteinlerin, farelerde her iki kist materyalinde de (kist sıvısı, kist membranı) 106, 48 ve 40 kDa'luk proteinlerin ortak glikoproteinler olduğu tespit edilmiştir. Bu glikoproteinlerin mannoz, galaktoz, N-asetil galaktozamin, sialik asit gibi şekerlerden bir yada bir kaçını içerdikleri belirlenmiştir.

Koyun ve farelerin kist sıvısı ve kist membranı açısından yapılan genel karşılaştırmasında ortak bantların, molekül büyüklüğü, glikoprotein varlığı ve şeker yapıları yönünden benzerlikler ve farklılıklar gösterdiği görülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** antijenik protein, fare, glikoprotein koyun, kist hidatik

## SUMMARY

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

Hydatid cyst disease (Hydatidosis) is a parasitic disease which is formed by *Echinococcus* genus belonging species and it is important and gives serious harms on human and animal health as well as its economic losses.

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. In mice cyst fluid and cyst membrane, 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 and 26 kDa. Common antigenic bands of hydatid membrane from sheep and mice found to be 48 and 40 kDa. Sugars of antigenic proteins in glycoprotein structure were determined by Dig-Glycan detection and Dig-Glycan differentiation kits. Glycan Analysis of samples showed that 116, 68 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, 48 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 fluid and cyst membrane 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

## KAYNAKLAR

- AKHAN, O. (2004). Karaciğer kist hidatiklerinin perkütan tedavisi. *Echinococcosis*, ed.: ALTINTAŞ, N. ve ark. Hidatidoloji Dern. Yayın. No:1, s: 239-248.
- AKMAN, Ş. (2002). Prion hastalıklarının patogenezi biyokimyasal yaklaşım., *Gülhane TD.*, **44**:(2): 230-239.
- AKYOL, Ç. V. (2001). Hidatidoz ve halk sağlığı yönünden önemi. *J. Fac. Vet. Med.*, **20**: 137-142.
- ALTINTAŞ, N., TINAR, R., ÇOKER, A. (2004). *Echinococcosis*. Hidatidoloji Derneği Yayın No:1
- AL-YAMAN, F.M., 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.
- ANUMULA, K.R. (2000). High-Sensitivity and High-Resolution Methods for Glycoprotein Analysis. *Anal. Biochem.*, **283**:17-26.
- BURGU, A., DOĞANAY, A., GÖNENÇ, B., SARİMEHMETOĞLU, H.O., 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.
- BURNIE, J.P., HOLLAND, M., MATTHEWS, R.C., LEES, W. (1987). Role of immunoblotting in the diagnosis of culture negative and enterococcal endocarditis. *J. Clin. Pathol.*, **40**: 1149-1158.
- CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., SANTUCCI, L., GHIGGERI, G.M., CARNEMOLLA, B., ORECCHIA, P., ZARDI, L., RIGHETTI, P.G. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, **25**: 1327–1333.
- CHAMEKH, M, FACON, B., DISSOUS, C., HAQUE, A., CAPRON, A. (1990). Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. *J. Immunol. Methods.*, **134**:129-137.
- CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. (1994). Lippincott's Illustrated Review's Serisinden Biyokimya. Çeviri Editörü: Tokullugil, A. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

- CRAIG P. S., McMANUS D.P., LIGHTOWLERS, M.W., CHABALGOİTY J.A., GARCİA, H.H., GAVİDİA, C.M., GİLMAN, R.H., GONZALEZ, A.E., LORCA, M., NAQUİRA, C., NİETO, A., SHANTZ, P.M. (2007). Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis.* Jun;7(6):385-94.
- ÇIRAK, V. Y. (2004). Hayvanlarda erişkin ve larver echinococcosisin tedavisi. Echinococcosis, ed.: ALTINTAŞ, N. ve ark. Hidatidoloji Dern. Yayın. No:1, s: 317-324.
- ÇİVİ, S., GÜLER, S., KESKİ, S., (1995). Konya EBK ve KONET tesisleri kayıtlarına göre kist hidatid nedeniyle oluşan ekonomik kayıplar. *T. Parazitol. Derg.*, **19**: 237-242.
- ÇOKER, A., ZEYTUNLU, M. (2004). Karaciğerde kist hidatik cerrahisi. Echinococcosis, ed.: ALTINTAŞ, N. ve ark. Hidatidoloji Dern. Yayın. No:1, s: 229-238.
- DI FELICE, G, PINI, C., AFFERNI C., VICARI, G. (1986). Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies . *Mol Biochem Parasitol.*, **20**(2):133-42.
- DOĞANAY, A., BURGU, A., GÖNENÇ B., SARİMEHMETOĞLU H.O. (2000). Koyun kist hidatik protoskolekslerinin protein yapısının analizi ve spesifik antijenlerin saptanması. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* **47**(1): 63-71.
- DRYER, R. L., LATA, G. F. (1989). *Experimental Biochemistry.* Oxf. Univ. Pres.
- DUNN, A. M. (1978). *Veterinary Helminthology.* Second ed. London: William Heineman Medical Books Ltd, p:119 -121.
- ELBEIN, A. (1999). *Complex Carbohydrates: Glycoproteins.* In: Crowe L ed. *Medical Biochemistry* Bynes. Mosby Publishing. England.
- EMEKLİ, N.B. (1981). Trombositlerde glikoprotein Sentezi, Galaktoz Transportu ve Trombosit Membran Glikoproteinleri (Doçentlik Tezi).
- ERRICO D.A., MEDEIROS A., MIQUEZ M., CASARAVILLA C., MALGOR R., CARMONA C., NIETO A., OSINAGA E. (2001). O-Glycosylation in *Echinococcus granulosus*: Identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. *Exp. Parasitol.*, **98**:100-109.
- FACON, B., CHAMEKH, M., DISSOUS, C., CAPRON A. (1991). Moleculer cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **45**: 233-240.

- FAILLARD, H. (1998). The early history of sialic acids, in proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic acids. (Eds. Schauer R., Tamakawa T.), pp.:6-18.
- FEIŽI, T. (1991). Cell-cell adhesion and membrane glycosylation. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1**: 766-770.
- FERRERÍA, A.M., WÜRSNNER R., HOBART M.J., LACHMANN, P.J. (1995). Study of the in vitro activation of the complement anternative pathway by echinococcus granulosus hydatid cyst fluid. *Parasite immunol.*, **17**, 245-251.
- GABIUS, H.J., GABIUS S. (1997), Glycosciences , Chapman&Hall. Weinheim.
- GHORUI S.K., PRASAD R.L., PAL. A.K., SAHAI B.N. (1990). Proteins and glycoproteins distribution in cyst wall and germinal layer of hydatid cyst. *Indian Vet. J.*, **67**: 802-804.
- 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. *Molecular and Biochemical Parasitology* **105**: 177-184.
- GOTTSCHALK, A. (1972). Glycoproteins, Elseiver Publishing Company. Amsterdam.
- GÖKÇEN A. (2002). Kist Hidatik ve aşı. *T parasitol Derg.*, **24**; 419-425.
- GÜRALP, N., (1981). Helmintoloji 2. baskı, Ankara. Ankara. Üniv. Vet. Fak. Yayın, 368/266 A. Ü. Basımevi, s: 221-239.
- ILICA, A. T., KOCAOĞLU M., ZEYBEK N, GÜVEN S, ADALETLİ, I., BAŞGÜL, A., ÇOBAN, H., BİLİCİ, A., BUKTE, Y. (2007). Extrahepatic abdominal hydatid disease caused by *Echinococcus granulosus*: imaging findings. *AJR Am J Roentgenol.* Aug; **189** (2): 337-43.
- IRABUENA O., NIETO A., FERREIRA A.M.,BATTISTONI J., FERRAGUT G. (2000). Characterization and optimization of Bovine *Echinococcus granulosus* cyst fluid to be used in immundiagnosis of hydatid disease by ELİSA *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, **42**(5): 255-262.
- KANVAR J.R, KAUSHIK S.P, SAWHNEY M.S., KAMBO M.S., MEHTA S.K.,VINAYAK V.K. (1992). Spesific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. *J.Med.Microbiol.*, **16**: 46-51.

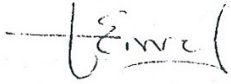


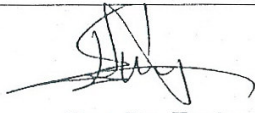
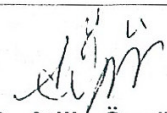
- KANVAR, J.R., VINAYAK, V.K. (1993). Isolation & immunochemical characterization of diagnostically relevant antigens of *Echinococcus granulosus*. *Indian J. Med. Res.*, **97**: 75-82.
- KARAÇALI, S. (2003). Glikobiyoloji; güncel moleküler biyoloji. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **27**:489-495.
- KARAMAN Ü., ATAMBAY M., AYGAN Ö.M., DALDAL N. (2002). İndirekt hemagglütinasyon tekniğinde (IHA) insan, inek ve koyun antijenlerinin karşılaştırılması. *T. Parazitol. Derg.*, **26**: 251-3.
- KHOO, K.K., NIETO, A., MORRIS H.R., DELL, A. (1997). Structural characterisation of the N-glycans from *Echinococcus granulosus* hydatid cyst membrane and protoscoleces. *Mol. Biochem. parasitol.*, **86**:237-248.
- KILIÇTURGAY, S. (2004). Hidatik kist hastalığında kemoterapi. *Echinococcosis*, ed.: ALTINTAŞ, N. ve ark. Hidatidoloji Dern. Yayın. No:1, s:249-257.
- KOBATA, A. (1992). Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, **209**; 483-501.
- KÖKSAL F., SERİN M.S., KEKEÇ Y., SADR. Y.E. (1995). İnsan ve hayvan kökenli kist hidatik sıvılarının SDS-PAGE metoduyla analizi ve westernblot metodunun klinik önemi. *T.Parazitol. Derg.*, **19**(2): 221-229.
- KÖKTÜRK, O., GÜRÜZ, Y., AKAY, H., AKHAN, O., BİBER Ç., ÇAĞIRICI, U., ÇETİN, G., ÇÖPLÜ, L., DOĞAN, R., DOĞANAY, A., DOĞRU, D., GÖÇMEN, A., GÜNGÖR, Ç., GÜRSES, A., KALAYCI, G., KAVUKÇU, Ş., ÖZACAR, R., ÖZHAN, M., TOPCU, S., UÇAN, E. S., YÜKSEL, M., (2002). Toraks derneği paraziter akciğer hastalıkları tanı ve tedavi rehberi 2002 . *Toraks Derg.* , **3**: 1-10.
- LAPAGE, G., (1968). *Veterinary Parasitology*. Second ed. Edinburg and London, Olivier and Boyd Ltd. p: 429-435.
- LEE. H.J., LEE C.S., KİM B.S., LEE J.S., KİM T.S., KİM H.R. (2002). Purification and characterisation of a 7 kDa protein from *Clonorchis sinensis* adult worms. *J. Parasitol.*, **88**: 499-504.
- LEGGATT G.R., YONG W., MCMANUS D.P. (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.
- LENNARZ, W.J., (1980). *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Plenum Press.

- LIGTOWLERS, M.W., LIU, D., HARALAMBOUS, A., RICHARD, M.D. (1989). Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem parasitol.*, **37**:171-182.
- LISOWSKA, E. (2002). The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**: 445-455.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., AND RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.
- MADDISON S.E, SLEMENDA S.B., SCHWANTZ P.M., FRIED J.A., WILSON M., TSANG V.C.W. (1989). A Specific diagnostic antigen of *Echinococcus Granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kda. *Am. J. Trop. Hyg.* , **40**(4): 377-383.
- MAMUTI W., YAMASAKI H., SAKO Y., NAKAYA K., NAKAO M., LIGTOWLERS M.W., ITO A. (2002). Usefulness of hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic echinococcosis in humans. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, **9**: 573-576.
- MARCH F., ENRICH C., MERCADER M., SANCHEZ F., MUNOZ C., COLL.P., PRATS G. (1991). *Echinococcus granulosus*: Antigen characterisation by chemical treatment and enzymatic deglycosylation. *Exp. Parasitol.*, **73**: 433-439.
- MERDİVENCİ A., AYDINOĞLU K., (1982). Hidatidoz (Hidatik Kist Hastalığı). İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayınları, Fatih Gençlik Matbaa İşletmesi. İstanbul
- MIGUEZ M., BAZ, a., NIETO, A.M (1996). Carbonhydrates on the surface of *Echinococcus granulosus* protoscoleces are immunodominant in mice. *Parasite Immunol.*, **18**: 559-569.
- MONTGOMERY, R., CONWAY, T.W., SPECTOR A.A., CHAPPELL D. (1996). *Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım. Çeviri Editörü: ALTAN, N. Palme Yayıncılık, Ankara.*
- MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W., (1996). *Harper'ın Biyokimyası. Çevirenler: DİKMEN, N., ÖZGÜNEN T. Barış Kitabevi, İstanbul.*
- NELSON, D.L., MICHAEL M.C. (2000). Carbonhydrates and Glycobiology. In: Ryan M ed. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Word Publishers. United states of America.

- NIGAM, V.N., CANTERO, A. (1973). Polysaccharides in cancer: Glycoproteins and glycolipids. *Adv. Cancer Res.*, **17**: 1-80.
- PORETTI D., FELLEISEN E., GRIMM F. (1999). Differential immundiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *Am J Trop. Med. Hyg.*, **60**: 193-198
- PROFUMO E., ORTONA E., RIGANO R., GIOIA I., NOTARGIACOMO S., IOPPOLO S., SIRACUSANO A. (1994). Cellular and humoral responses to antigenic subunits of echinococcus granulosus cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol.*, **16**: 393-398.
- REYNOLDS, J. A. and TANFORD, C. (1970). The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.*, **245**: 5161-5165.
- RUDD, P.M., ELLIOTT, T., CRESSWELL, P., WILSON, I.A., DWEK, R.A. (2001). Glycosylation and the Immune system. *Science*, **291**:2370-2376.
- SARIMEHMETOĞLU O.H., KUBAR A., TANYÜKSEL M., GÜN H. (1998). Koyun karaciğer kist sıvısından 8 kDa'luk antijenin purifikasyonu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. **22**(2): 137-141.
- SBIHI, Y., JANSEN, D., OSUNA, A.. (1996). Serologic Recognition of Hydatid cyst antigens using different purification methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **24**: 205-211
- SCHANTZ, P. M. (1982). Echinococcosis. In: Handbook Series in Zoonoses. Chief Ed.: J. H. Steele Boca Roton, Florida. CRC Press. Inc.
- SHEPHERD, J.C., McMANUS, D.P. (1987). Specific and cross-reactive antigens of Echinococcus granulosus Hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem Parasitol.*, **25**:143-154.
- SIRACUSANO, A., IOPPOLO, 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.
- STOTT, D. I. (1989). Immunoblotting and dot blotting. *J. Immunol. Methods*, **12**;119(2):153-87.
- ŞAŞMAZ E., HASHEMPOOR G.R., BAHAR İ.H., YULUĞ N. (1995). Comparative antigenic analysis in Echinococcus granulosus. *T. Parasitol Derg.*, **19**(1): 83-87.

- ŞİMŞEK, S., ÜTÜK, A.E., BABÜR, C., KÖROĞLU, E. (2004). Ekinokok Antijenleri. *Akciğer arşivi*. **5**(3): 158-161.
- TINAR, R. (1979). Kuzularda yapay olarak oluşturulan kist hidatik'lere bazı yeni antelmentiklerin etkisi üzerine araştırmalar. *Ankara üniv. Vet. Fak. Derg.*, **26**(1-2):145-168.
- TINAR, R., COŞKUN, Ş. Z. (1991). Hayvanlarda kist hidatik (Echinococcoses). İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis), ed. : Unat E.K. ve ark. Türkiye Parazitoloji Dern. Yayın. No.10, s:157-196.
- TİĞİN, Y., BURGU, A., DOĞANAY, A., (1991). Hayvanlarda ekinokok türleri (Echinococcus sp.). İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis), ed: Unat E.K. ve ark. Türkiye Parazitoloji Dern. Yayın. No.10, s:129-155.
- THOMAS, C. C. (1974). General Parasitology. Second Press, London. Academic Press, Inc. Ltd. p: 510-515.
- ÜNER, A. (1991). Ekinokokların sistematiği ve biyolojisi. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis), ed. : Unat E.K. ve ark. Türkiye Parazitoloji Dern. Yayın. No.10, s:13-28.
- VAN, OSS, C. J., GOOD, R. J., CHAUDHURY, M. K. (1987). Mechanism of DNA (Southern) and protein (Western) blotting on cellulose nitrate and other membranes. *J. Chromatogr.*, 391-395.
- WALSH, G., JEFFERİS, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol.* Oct; **24** (10): 1241-52.
- VARKI, A., CUMMINGS, R., ESKO, J., FREEZE, H., HART, G., MARTH, J., (1999). Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New york.
- YAMAGUTI, S. (1959). Systema Helminthum. Volume II. The Cestodes of Vertebrates,-Newyork. Interscience Publishers, Inc. p:441-443.
- YAVUZ. Ö. (2001). Glikoproteinler ve Biyomedikal Önemi. *T. Klin Tıp Bilimleri Dergisi*, **21**:517-522.
- ZHANG X.L. (2006) Roles of glycans and glycopeptides in immune system and immune-related diseases. *Curr Med Chem.* **13**(10):1141-7.
- ZINGALES, B. (1984). Analysis of proteins by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: Genes and Antigens of Parasites. C.M Morel, Ed Fiocruz, Rio de Janeiro. 357-363.

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ**  
**Etik Kurul Kararları**

<b>Karar Sayısı : 2004/52</b>	<b>Karar Tarihi: 29 Aralık 2004</b>	
<p>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kuruluna Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalından gönderilen "<i>Koyunlarda ve Farelerde Kist Hidatik Proteinlerinin Karşılaştırılması ve Spesifik Antijenlerde Glikoprotein Varlığının Değerlendirilmesi</i>" başlıklı proje değerlendirilmiştir.</p> <p>Çalışmada, standart koşullarda beslenmiş 15-25 günlük 40 adet Swiss albino fare ile Ankara ve çevre mezbahalarda standart koşullarda kesilen 20 kist hidatikli, 10 sağlıklı olmak üzere toplam 30 koyun kullanılacaktır.</p> <p>Çalışma sırasında hayvanlara uygulanacak olan işlemlerin uygun yöntem ve maddeler kullanılarak yapılacak olması, çalışma sonunda deney hayvanlarına uygun yöntem ve materyal ile ötenazi uygulanacak olması bilimsel araştırmalarda göz önünde bulundurulması istenen "<i>refinement ilkesi</i>" ile örtüşmektedir.</p> <p>Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesinin 13. Maddesinde belirtilen "<i>etik kurallara uygunluk esası</i>" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.</p> <p>Yönergede belirtilen "<i>Araştırmacıların Sorumlulukları</i>" ve "<i>Hayvan Deneyleri ile İlgili İlkeler</i>" başlıkları altındaki etik kurallar saklı kalmak koşuluyla projenin hazırlanmasında "<i>Etik Kurul Yönergesi</i>" ilkelerine uyulduğuna karar verilmiştir.</p>		
 <b>Prof. Dr. Bahri Emre</b> <b>Başkan</b>	 <b>Prof. Dr. Öznur Poyraz</b> <b>Başkan Yardımcısı</b>	 <b>Prof. Dr. Bahattin Koç</b> <b>Üye</b>
 <b>Doç. Dr. Ender Yarsan</b> <b>Üye</b>	 <b>Yrd. Doç. Dr. Atilla Özgür</b> <b>Raportör</b>	

## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Serap ÜNÜBOL AYPAK  
Doğum Tarihi : 18 Ağustos 1977  
Doğum yeri : Aydın/Yenipazar  
Medeni Hali : Evli  
İletişim adresi ve Telefonu : Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi Biyokimya AD. Işıklı/AYDIN  
0256 2470700

### II. Eğitim-Öğretim

Üniversite : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
1994-2000  
Doktora : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü, 2002-2007  
Doktora Tez Konusu : Koyun ve Farelerde Kist Hidatik  
Proteinlerinin Karşılaştırmalı Analizi ve  
Antijenik Proteinlerde Glikoprotein  
Varlığının Değerlendirilmesi  
Doktora Tez Danışmanı : Doç. Dr. Hamdi UYSAL

### III. Akademik Yükselmeler

Araştırma Görevlisi : Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı,  
Temmuz 2001-Eylül 2002  
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü, 2002-2007  
Yabancı Dil : İngilizce  
Yabancı Dil Sınavı : ÜDS – 67,5

#### **IV. Yayınlar**

##### Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler:

1. Determination of the Levels of Zinc, Copper, Calcium, Phosphorus and Magnesium of Chios Ewes in the Aydın Region. *Turk J Vet Anim Sci* 28 (2004) 609-612

##### Ulusal Kongrelerdeki Bildiriler:

1. Koyun ve Farelerde Kist Hidatik Antijenik Proteinlerinin İmmunblotting Yöntemi ile Belirlenmesi ve Karşılaştırılması. 3. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi. 21-23 Haziran 2007. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi.