

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PROGRAMI
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ECHINOCOCCUS GRANULOSUS'UN SIĞIR VE
KOYUN İZOLATLARININ MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU, HAPLOTİP ANALİZİ VE
MİRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Bünyamin İREHAN
2022**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU _____

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU _____

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK _____

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ _____

Prof. Dr. Önder DÜZLÜ _____

Doç. Dr. Nermin IŞIK USLU _____



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Bünyamin İREHAN

Tarih : 28.11.2022

İmza :

Danışman
Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
ELAZIĞ

İTHAF

Bu tezi kıymetli eşim Ayşe İREHAN'a, biricik çocuklarım İlksen Çağla, Cemre, Yusuf ve Elif'e ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince yakın ilgi ve alakasını gördüğüm, tezimin her aşamasında sürekli destek olan, kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU'na ve doktora eğitimimin her aşamasında, her türlü desteği esirgemeyen, bilimsel anlamda çok büyük katkılar sağlayan, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK'e çok teşekkür ederim. Ayrıca Anabilim dalımızın kıymetli hocaları Prof. Dr. Münir AKTAŞ, Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ ve Doç. Dr. Sezayi ÖZÜBEK'e ve Arş. Gör. Mehmet Can ULUÇEŞME'ye, tez çalışmasının her aşamasında sürekli destek olan Arş. Gör. Figen ÇELİK'e teşekkür ederim. Tez çalışmamın analizlerinde laboratuvar desteğinden ötürü Doç. Dr. Ahmet TEKTEMUR'a ve katkılarından dolayı Doktor Öğretim Üyesi Harun Kaya KESİK ve Doktor Öğretim Üyesi Şeyma GÜNYAKTI KILINÇ'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana destek olan annem Kadriye İREHAN ve babam Adnan İREHAN'a, eşim Ayşe İREHAN'a, kızlarım İlksen Çağla, Cemre ve Elif'e ve oğlum Yusuf'a teşekkür ederim.

Son olarak Doktora tez çalışmasına maddi destek sağladığı için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK-Proje No: 200986) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. <i>Echinococcus</i> Cinsinin Morfolojisi	5
3.2. <i>Echinococcus</i> 'un Yaşam Döngüsü	6
3.3. Tür İçi ve Türler Arası Varyasyonun Epidemiyolojik Önemi	7
3.4. Kistik Ekinokokkozis'in Yaygınlığı.....	7
3.4.1. Kistik Ekinokokkozis'in Dünya'daki Yaygınlığı	7
3.4.2. Kistik Ekinokokkozis'in Türkiye'deki Yaygınlığı	9
3.5. Kistik Ekinokokkozis'in Ekonomik Önemi	10
3.6. Kistik Ekinokokkozis'in Halk Sağlığı Açısından Önemi.....	10
3.7. Kistik Ekinokokkozis'in Tanısı	11
3.8. Kistik Ekinokokkozis'in Tedavisi	11
3.9. Kistik Ekinokokkozis'de Korunma ve Kontrol.....	12
3.10. Kistik Ekinokokkozis'in Dünya'daki Moleküler Epidemiyolojisi.....	13
3.11. <i>Echinococcus</i> Türlerinin Taksonomisi ve Genotipleri	13
3.12. Türkiye'de Yapılan Moleküler Epidemiyoloji ve Genotiplendirme Çalışmaları.....	16
3.13. <i>Echinococcus granulosus</i> 'ta microRNA Çalışmaları.....	20
4. GEREÇ VE YÖNTEM	33
4.1. Materyal.....	33

4.1.1. Hidatik Kist Örneklerinin Toplanması	33
4.2. Genomik DNA İzolasyonu	34
4.3. DNA Nanodrop Ölçümleri	35
4.4. mt-CO1 Geninin PCR ile Çoğaltılması	35
4.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Dizilenmesi.....	37
4.6. mt-CO1 Geninin Dizi Analizi, Alignment ve Filogenetik Analiz.....	37
4.7. Haplotip Analizi	38
4.8. Total RNA İzolasyonu.....	38
4.9. RNA Nanodrop Ölçümleri	40
4.10. Total RNA Konsantrasyonlarının RT-qPCR Analizleri İçin Standardizasyonu.....	41
4.11. Reverse Transcription Stem Loop Primerler	41
4.12. Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR) Mastermiks ve Termal Döngü.....	42
4.13. miRNA Profili ve Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	43
4.14. Real Time PCR.....	44
4.15. İstatistiksel Analiz	46
5. BULGULAR	47
5.1. mt-CO1 PCR Bulguları	48
5.2. mt-CO1 Geninin Sekans Analiz Bulguları	49
5.2.1. Alignment Analiz Bulguları.....	50
5.2.2. Filogenetik Analiz Bulguları	52
5.2.3. Haplotip Analizi, Nükleotid Polimorfizmi, Çeşitlilik ve Tarafsızlık İndeksleri	53
5.3. Total RNA Nanodrop Ölçümleri	60
5.4. Hidatik Kist Örneklerinde miRNA Ekspresyonu	63
5.4.1. Sığır Orjinli Hidatik Kist Örneklerinde miRNA Ekspresyonu.....	63
5.4.2. Koyun Orjinli Hidatik Kist Örneklerinde miRNA Ekspresyonu.....	66
5.4.3. Protoskoleks ve Germinal Membranlardaki miRNA Ekspresyonu	70
5.4.4. Sığır ve Koyun Orjinli Hidatik Kist Örneklerinde Haplotip Grupları Arasında miRNA Ekspresyonu.....	73

5.4.5. <i>E. canadensis</i> (G6/7) Örneği ile Haplotip Grupları Arasında miRNA Ekspresyonu.....	77
6. TARTIŞMA	81
7. KAYNAKLAR	98
8. EKLER.....	108
9. ÖZGEÇMİŞ.....	109



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	<i>Echinococcus</i> spp.'nin güncel taksonomisi	15
Tablo 2.	Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden bildirilen <i>E. granulosus</i> suşları.	19
Tablo 3.	<i>Echinococcus</i> spp.'de eksprese olan miRNA'lar	24
Tablo 4.	<i>E. granulosus</i> s.l. mt-CO1 gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primer dizisi.....	35
Tablo 5.	<i>E. granulosus</i> s.l. mt-CO1 gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PCR mastermiksi.....	36
Tablo 6.	<i>E. granulosus</i> s.l. mt-CO1 geninin PCR analizinde kullanılan thermal cycler döngüsü.....	37
Tablo 7.	RT aşamasında kullanılan RT primer, RT stem loop primer ve miRNA sekansları.....	42
Tablo 8.	Hedef miRNA ve internal kontrol geni için RT-qPCR mastermiksi. 43	
Tablo 9.	RT-qPCR Thermal Cycler Döngüsü.	43
Tablo 10.	Real Time PCR primer sekansları.....	44
Tablo 11.	Hedef miRNA ve internal kontrol geni için Real Time PCR mastermiksi.	45
Tablo 12.	Real Time PCR termal döngü ve melting curve koşulları.	45
Tablo 13.	Hidatik kist izolatlarının organ yerleşimleri.....	48
Tablo 14.	GenBank'ta kayıt altına alınan sekanslara ait accession numaraları..	50
Tablo 15.	mt-CO1 geninin (792 bp) analiz edilen 29 haplotip arasında nükleotid varyasyon pozisyonları.....	51
Tablo 16.	<i>E. granulosus</i> s.s. (G1 ve G3) sığır izolatlarının mt-CO1 geninin (792 bp) nükleotid verileri kullanılarak elde edilen çeşitlilik ve nötrlük indeksleri.	54
Tablo 17.	<i>E. granulosus</i> s.s. (G1 ve G3) koyun izolatlarının mt-CO1 geninin (792 bp) nükleotid verileri kullanılarak elde edilen çeşitlilik ve nötrlük indeksleri.	56

Tablo 18. <i>E. granulosus</i> s.s. (G1 ve G3) koyun ve sığır izolatlarının mt-CO1 geninin (792 bp) nükleotid verileri kullanılarak elde edilen çeşitlilik ve nötrlük indeksleri.....	57
Tablo 19. Koyun orjinli 41 ve sığır orjinli 40 hidatik kist örneğinde belirlenen haplotip grupları ve gruplardaki örnek sayıları.	58
Tablo 20. Sığır orjinli hidatik kist örneklerinde total RNA izolatlarının nanodrop ölçüm sonuçları.	61
Tablo 21. Koyun orjinli hidatik kist örneklerinde total RNA izolatlarının nanodrop ölçüm sonuçları.	62
Tablo 22. Sığır orjinli hidatik kistlerde, haplotip grupları arasında miRNA'ların ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.....	65
Tablo 23. Koyun orjinli hidatik kistlerde, haplotip grupları arasında miRNA'ların ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.....	69
Tablo 24. Koyun orjinli fertil hidatik kistlerde, germinal membran ve protoskoleks yapılarında miRNA'ların ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.....	72
Tablo 25. Sığır ve koyun orjinli hidatik kistlerde haplotip grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.	75
Tablo 26. <i>E. canadensis</i> (G6/7) örneği ile bütün haplotip grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.	79

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Mezbahaneden toplanan hidatik kistli organların görünümü..... 47
- Şekil 2.** Koyun karaciğer hidatik kistinden elde edilen protoskolekslerin mikroskopik görüntüsü (X40). 48
- Şekil 3.** Sığır ve koyun izolatlarının mt-CO1 gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü. 49
- Şekil 4.** *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) ve *E. canadensis* (G6/7) izolatlarına ait filogenetik ağaç. 53
- Şekil 5.** *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) sığır izolatlarının (792 bp) mt-CO1 geni için haplotip ağı. 54
- Şekil 6.** *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) koyun izolatlarının (792 bp) mt-CO1 geni için haplotip ağı. 55
- Şekil 7.** *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) koyun ve sığır izolatlarının (792 bp) mt-CO1 geni için haplotip ağı. 57
- Şekil 8.** Sığır orjinli hidatik kistlerde haplotip gruplarına göre miRNA ekspresyon düzeyleri (Hap_01 kontrol grubu). 64
- Şekil 9.** Koyun orjinli hidatik kistlerde haplotip gruplarına göre miRNA ekspresyon düzeyleri (Hap_03 kontrol grubu). 67
- Şekil 10.** Koyun orjinli fertil 10 hidatik kist örneğinde, germinal membran ve protoskolekslerdeki ortalama miRNA ekspresyon düzeyleri (protoskoleks kontrol grubu) (protoskoleks kontrol grubu). 71
- Şekil 11.** Sığır ve koyun orjinli hidatik kist örneklerinde haplotip grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri (Hap_01 kontrol grubu). 74
- Şekil 12.** *E. canadensis* (G6/7) örneği ile tüm haplotip grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri (*E. canadensis* (G6/7) kontrol grubu). 78

KISALTMALAR LİSTESİ

AE	Alveolar Ekinokokkozis
AGO	RNA-binding protein Argonaute
BT	Bilgisayarlı Tomografi
cDNA	Komplementer DNA
ceRNA	Competing endogenous RNA
circRNA	Circular RNA (daireseel RNA)
Ct	Cycle Threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
IFAT	İmmun Floresan Antikor Tekniği
IHA	İndirekt Heamaglutinasyon Testi
ITS-1	Internal Transcribed Spacer 1
KE	Kistik Ekinokokkozis
LncRNA	Long non-coding RNA (Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA)
ME	Moleküler Epidemiyoloji
miRNA	mikroRNA
MR	Manyetik Rezonans
mt-CO1	Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunite 1
ng	Nanogram
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Polikistik Ekinokokkkozis
piRNA	Piwi-interacting RNA (Piwi etkileşimli RNA)
pre-miRNA	prekürsör miRNA
pri-miRNA	birincil miRNA
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polymorphism
RISC	RNA-induced silencing complex
RT	Reverse Transcription
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription PCR
siRNA	Small Interfering RNA
snRNA	Small Nuclear RNA
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TAE	Tris-asetat-EDTA
TRBP	TAR-RNA-binding protein
USG	Ultrasonografi
WB	Western Blot
µl	Mikrolitre

1. ÖZET

Kistik Ekinokokkozis (KE), *Echinococcus granulosus*'un larval formu tarafından oluşturulan, insanlarda ve ara konak hayvanlarda dünya çapında yaygın olarak görülen zoonotik bir helmint hastalığıdır. *E. granulosus*'taki genetik farklılıkların tespit edilmesi, hastalığın patojenitesi, bulaş yolu ve mücadele yöntemlerinin belirlenmesi bakımından önemlidir. *E. granulosus*'un konak ve parazit ilişkisindeki mekanizmaları açıklamaya çalışan yaklaşımlardan biri mikroRNA'lardır. Bu çalışmada sığır ve koyun orjinli hidatik kist izolatlarında *E. granulosus* s.l. genotip ve haplotip grupları belirlenerek, farklı kist yapılarında ve gruplar arasında, egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Hedef miRNA'ların hastalığın tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeli araştırılmıştır. Toplam 82 hidatik kist izolatından (41 sığır, 41 koyun) 81'inin genotipi, mt-CO1 gen bölgesine yönelik PCR ve sekans analizleriyle *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olarak belirlenirken, sığır orjinli bir izolatın genotipi *Echinococcus canadensis* (G6/7) olarak tespit edilmiştir. Örneklerde toplam 26 nükleotid polimorfizmi ve 29 haplotip grubu belirlenmiştir. Steril kistlerde germinal membranlarda, fertil kistlerin germinal membran ve protoskolekslerinde miRNA ekspresyonları qRT-PCR ve Real Time PCR analizleri ile araştırılmıştır. *E. canadensis* (G6/7) örneği kontrol olarak seçilerek tüm haplotip gruplarındaki miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. miRNA'ların 29 haplotip grubunun %79.31'inde yüksek, %10.345'inde düşük düzeyde eksprese olduğu belirlenmiştir. Koyun orjinli fertil 10 örnekte, protoskoleks yapısına kıyasla germinal membranda ortalamada egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının sırasıyla 44, 168 ve 351 kat yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği

belirlenmiştir. Genotip ve haplotip grupları arasında yüksek oranda istatistiki olarak anlamlı olan ekspresyon düzeyi farklılıkları tespit edilmiştir. Sonuç olarak, egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ve özellikle egr-miR-96'nın aktif KE teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyelinin olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Echinococcus granulosus*, haplotip analizi, miRNA, egr-miR-7, egr-miR-71, egr-miR-96.



2. ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CATTLE AND SHEEP ISOLATES OF *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*, HAPLOTYPE ANALYSIS, AND DETERMINATION OF miRNA EXPRESSION LEVELS

Cystic Echinococcosis (CE) is a zoonotic helminth disease caused by the larval form of *Echinococcus granulosus*, which is common in humans and intermediate host animals worldwide. Detection of genetic differences in *E. granulosus* is important in terms of determining the pathogenicity of the disease, transmission route and control methods. One of the approaches trying to explain the mechanisms in the host-parasite relationship of *E. granulosus* is microRNAs. In this project, *E. granulosus* s.l. genotype and haplotype groups were determined in hydatid cyst isolates of cattle and sheep origin, and the expression levels of egr-miR-7, egr-miR-71 and egr-miR-96 miRNAs were compared in different cyst structures and between groups. The potential of target miRNAs to be used as a biomarker in the diagnosis of the disease was investigated. Genotypes of 81 out of 82 hydatid cyst isolates (41 cattle, 41 sheep) were determined by PCR and sequence analyzes for the mt-CO1 gene region of *E. granulosus* s.s. (G1 and G3), the genotype of an isolate of cattle origin was *Echinococcus canadensis* (G6/7). A total of 26 nucleotide polymorphisms and 29 haplotype groups were identified in the samples. miRNA expressions in germinal membranes of sterile cysts and germinal membrane and protoscoleces of fertile cysts were investigated by qRT-PCR and Real Time PCR analyses. *E. canadensis* (G6/7) sample was selected as control and miRNA expression levels in all haplotype groups were compared. It was determined that miRNAs were expressed at high levels in 79.31% of 29 haplotype groups and at low levels in 10.345%. In 10 fertile samples of sheep origin, egr-miR-

7, egr-miR-71 and egr-miR-96 miRNAs were found to be 44, 168, and 351-fold higher in expression, respectively, in the germinal membrane compared to the protoscolex structure. High statistically significant differences in expression levels were detected between genotype and haplotype groups. In conclusion, it has been shown that egr-miR-7, egr-miR-71 and egr-miR-96 miRNAs, and especially egr-miR-96, may have the potential to be used as biomarkers in the diagnosis of active CE.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, haplotype analysis, miRNA, egr-miR-7, egr-miR-71, egr-miR-96.



3. GİRİŞ

Kistik Ekinokokkozis (KE), *Echinococcus granulosus* tarafından insanlarda ve hayvanlarda oluşturulan önemli zoonotik hastalıklardan biridir. Az gelişmiş ülkelerde, özellikle kırsal bölgelerdeki insan ve hayvanlarda sıklıkla görülmekte olup, insanlarda ciddi sağlık problemlerine, hayvanlarda ise önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (1). Parazitin erişkin formları köpek, kurt, çakal ve diğer kanidelerin ince bağırsaklarına, larva formu olan hidatik kist ise sığır, koyun, keçi, domuz gibi birçok evcil ve yabani hayvanların ve insanların karaciğer ve akciğer başta olmak üzere çeşitli organlarına yerleşmektedir (2).

3.1. *Echinococcus* Cinsinin Morfolojisi

Echinococcus cinsindeki parazitler, Eucestoda alt sınıfında, Taeniidae ailesine ait parazitlerdir. *Echinococcus* cinsi, Taeniidae ailesinde bulunan diğer parazitlerden farklı bazı özelliklere sahiptir. Vücut uzunluğu birkaç mm olup, genellikle üç ya da dört, nadiren beşten fazla halka taşımaktadır. *Echinococcus* türünün yaşam döngüsünde, ince bağırsakta geliştiği etçil bir son konak ve metasestodunun iç organlarda geliştiği otçul veya omnivor bir ara konak bulunmaktadır. Metasestod yapıları, Taeniidae'den farklı olarak, düşük derecede konak özgüllüğü göstermekte ve yine bu aileden farklı olarak, çok daha büyük bir üreme yeteneğine sahiptirler. Son konak her zaman bir kanidedir. Metasestod, protoskoleks üretmek için aseksüel çoğalmaya maruz kalan, içi kist sıvısı ile dolu kistik bir yapıdır. Tek bir kist içinde binlerce protoskoleks bulunabilmektedir. Protoskoleksler son konağın bağırsağında erişkin parazite dönüşmekte ve takiben erişkin parazitlerin her biri tek bir embriyo (onkosfer) içeren döllenen yumurtalar

üretmektedir. Tam ve gelişmesini tamamlamış yumurtaları içeren gebe halkalar, son konağın dışkılarıyla dış ortama atılmaktadır. Yumurtalar son konağın perianal bölgesine yapışabilmekte veya çevreyi kontamine edebilmektedir. Gebe halkalardan dışarı çıkan yumurtalar kalın, dayanıklı bir cidar ile çevrili olup, dış ortamda uzun süre canlılığını koruyabilmektedir (3).

3.2. *Echinococcus*'un Yaşam Döngüsü

Onkosfer içeren yumurta ara konaklar tarafından genellikle beslenme esnasında alınmaktadır. Alınan yumurtalar midede açılmakta ve onkosfer yumurtadan serbest kalmaktadır. İnce bağırsakta aktive olan onkosfer mukozaya tutunmakta ve kan dolaşımı ile iç organlara taşınmaktadır. İç organlara tutunan onkosferden parazitin larval formu olan hidatik kist gelişmektedir. Oluşan kistler içerisinde aseksüel çoğalma ile çok sayıda protoskoleks gelişmektedir. Hidatik kist ile enfekte hayvanların iç organları son konak kanideler tarafından yenildiğinde, kist içerisindeki protoskoleksler serbest kalarak bağırsak villuslarına tutunup, parazitin erişkin formlarını geliştirmektedirler (4).

E. granulosus türleriyle enfeksiyon, insanlarda, son konak olan kanidelerde ve ara konak olan diğer hayvan türleri arasında meydana gelmektedir. Parazitin klinik ve ekonomik önemi neredeyse tamamen metasestod enfeksiyonu ile ilgilidir. *Echinococcus* metasestodu ile oluşan enfeksiyonlar için *Echinococcosis* teriminin kullanılması konusunda fikir birliği oluşmuştur. Son zamanlarda, insanlarda *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus oligarthra* ve *Echinococcus vogeli* 'nin neden olduğu hastalıklar için, sırasıyla Kistik Ekinokokkozis (KE), Alveolar Ekinokokkozis (AE) ve Polikistik Ekinokokkozis (PE) terimleri kullanılmıştır (3).

3.3. Tür İçi ve Türler Arası Varyasyonun Epidemiyolojik Önemi

E. granulosus'un at ve koyun suşları üzerinde yapılan araştırmalar ile birkaç yeni suş/genotipin tanımlanması ve karakterizasyonlarının belirlenmesi; sığır, domuz, deve ve geyik kökenli *Echinococcus* türlerinde de benzer çalışmaların yapılmasına yol açmıştır (5). Bu çalışmalar, yalnızca dünyanın farklı yerlerinde *Echinococcus* türlerinin konağa uyarlanmış bir dizi yaşam döngüsünün varlığını doğrulamış ve suşlar arasında enfeksiyonun kontrolünü etkileyebilecek gelişimsel farklılıklar hakkında ek bilgiler sağlamıştır (6). Konağa özgü *Echinococcus* türlerinin yaşam döngülerini göz önünde bulundurarak, dejeneratif değişiklik olmaksızın uzun süre hayatta kalan ve yüksek protoskoleks üretimi olan tek tip bir larva yapısının bulunduğu bildirmiştir. Bu durumun *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. intermedius* ve *E. felidis* türleri için geçerli olduğu ifade edilmiştir (7). Gelecekte, özellikle Afrika ve Çin gibi bölgelerde yaban hayatı parazitlerini araştıran daha fazla çalışma ile yeni *Echinococcus* türlerinin keşfedilmesi beklenmektedir.

3.4. Kistik Ekinokokkozis'in Yaygınlığı

3.4.1. Kistik Ekinokokkozis'in Dünya'daki Yaygınlığı

Echinococcus granulosus tarafından oluşturulan KE, Dünya'nın hemen hemen her bölgesinde görülmekte olup, yapılan çalışmalar etkenin geniş bir yayılım alanına sahip olduğunu göstermektedir (8).

Amerika Birleşik Devletleri sınırları içerisindeki Maine bölgesinde gerçekleştirilen bir çalışmada, 54 sığın geyiği (*Alces alces*) hidatik kist yönünden

incelenmiş ve incelenen örneklerde %39 oranında hidatik kist tespit edildiği bildirilmiştir (9).

Hidatik kistin yaygınlığı ile ilgili Kanada'da yapılan çalışmalar, ren geyikleri başta olmak üzere, Amerikan bizonlarında ve karibularda yapılmıştır (10-12). Etkenin biyolojisinde son konak olarak görev yapan kurtlarda *E. granulosus* oranının %6-24 olduğu, ara konak geyiklerde ve ren geyiklerinde ise sırasıyla %42-47 ve %1-21 oranlarında görüldüğü bildirilmiştir (10-12).

Arjantin'de koyun, domuz, sığır ve köpeklerde *E. granulosus*'un prevalansının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada enfeksiyon oranı sırasıyla %3, %1.6, %2.9, %2.5 olduğu belirlenmiştir (13).

Brezilya'nın Rio Grande do Sul bölgesinde, *E. granulosus*'un köpek, sığır ve koyunlarda enfeksiyon oranlarının sırasıyla %11, %12 ve %17 olduğu, ülkenin diğer bölgelerinde ise daha düşük oranlarda (%0.1) görüldüğü bildirilmiştir (14).

Suudi Arabistan'ın batı Al-Baha yöresinde sığır, koyun, keçi ve develerde sırasıyla %8.3, %12.6, %6.6 ve %32.9 oranlarında KE pozitiflikleri saptanmıştır (15).

İran'da çiftlik hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda, KE oranının koyunlarda, keçilerde, sığırlarda, mandalarda, develerde ve eşeklerde sırasıyla %1.3-74.4, %0.4-37.8, %1.3-40.1, %4.3-31.9, %8.8-35.5 ve %2 olduğu belirlenmiştir (16-19).

Tunus'da *E. granulosus* yaygınlığının köpeklerde %20'den fazla olduğu, koyun, keçi ve sığırlarda KE enfeksiyonunun sırasıyla %16.4, %2.8 ve %8.56 oranında olduğu bildirilmiştir (20).

3.4.2. Kistik Ekinokokkozis'in Türkiye'deki Yaygınlığı

KE'in Türkiye'nin tüm bölgelerinde geniş bir yaygınlık gösterdiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (21).

Mezbaha muayenesi ile yapılan çalışmalarda, Erzurum'da %19.5-90, Kars'da %24.7-50, Van'da ise %19.4-37.8 oranında KE yaygınlığı bildirilmiştir. Türkiye'de *E. granulosus*'un köpeklerde %24 oranında görüldüğü, KE'in koyunlarda %51.9, sığırlarda %39.7 ve keçilerde ise %22.1 oranında yaygın olduğu ifade edilmiştir (22-26).

KE'in, Türkiye'de sığırlardaki görülme oranı ile ilgili yapılan çalışmalarda, Erzurum, Kars, Sivas, Samsun, Afyonkarahisar, Kırıkkale, Burdur, Ankara, Manisa, Malatya, Konya ve Kayseri illerinde ve Trakya bölgesinde sırasıyla %33.9-%46.41, %5.3-%31.25, %35.7-%39.7, %21.1, %29.47, %14.16, %13.5, %9.4, %8.96, %7.6, %5.6, %3 ve %11.6'lık yaygınlık oranları rapor edilmiştir (27).

KE'in Türkiye'de koyunlardaki yaygınlığının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, Erzurum, Kars, Konya, Bursa, Sivas, Burdur, Manisa, Malatya, Ankara illerinde ve Trakya bölgesinde sırasıyla %70.91, %48.35-63.85, %51.98, %30-50.7, %32.49, %26.6, %15.98, %9.1, %5.9 ve %3.5 oranlarında pozitifliklerin olduğu saptanmıştır (28-30).

E. granulosus'un köpeklerdeki yaygınlık oranının Ankara, Bursa, Kars, Sivas, Konya, Adana, Kayseri, Muş, Antakya, İzmir, Elazığ ve İstanbul illerinde sırasıyla %0.94-44, %36, %40.5, %16-28, %28.33, %24.72, %24, %9, %8.86, %5.5, %3.33 ve %0.8 oranlarında olduğu belirlenmiştir (27).

3.5. Kistik Ekinokokkozis'in Ekonomik Önemi

KE insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonlar oluşturabilmekte ve buna bağlı olarak hayvanlarda ciddi ekonomik kayıpların oluşmasına yol açmaktadır (31). Çiftlik hayvanlarında oluşan enfeksiyon et ve süt veriminde azalma, yün ve yapağı kalitesinde düşme, fertilitate problemleri, kısırılık oranının yükselmesi, canlı ağırlık kaybı ve mezbahanelerde kesimi yapılan hayvanlarda başta karaciğer olmak üzere imha edilen kistli organlardan dolayı ciddi boyutlarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır (32). KE'in Dünya'daki ekonomik etkileri ve kayıpları göz önüne alındığında, Çin'de yapılan bir araştırmada hastalığın insan ve hayvanlarda oluşturduğu ekonomik kayıpların toplamının yıllık 218.676 USD (189.850-247.871) civarında olduğu bildirilmiştir (33). KE'in çiftlik hayvanlarında neden olduğu yıllık kaybın 141.605.195 USD, yün ve yapağı kayıplarının 34.871.148 USD, karkas kayıplarının 241.525.979 USD, süt üretimindeki kayıpların 378.722.717 USD, fertilizasyon problemlerinden dolayı oluşan kaybın ise 453.141.617 USD olduğu hesaplanmaktadır (34).

3.6. Kistik Ekinokokkozis'in Halk Sağlığı Açısından Önemi

KE, insan ve ara konak hayvanların iç organlarında *E. granulosus*'un larva evresinin oluşturduğu hastalık tablosudur. İnsanlarda, asemptomatikten, ölümcül olabilen enfeksiyonlara kadar değişen formda hastalık tablosuna yol açmaktadır. Dünya çapında yaklaşık 2-3 milyon insan vakasının olduğu tahmin edilmektedir (35).

3.7. Kistik Ekinokokkozis'in Tanısı

Echinococcus enfeksiyonlarının son konaklardaki tanısı, etken ile ilgili geliştirilecek olan mücadele, kontrol ve eradikasyon programları ile epidemiyolojik olarak etkenin prevalansının kontrol altına alınması bakımından önemlidir (36).

Son konaklar *Echinococcus* spp. ile enfekte olduklarında, klinik semptom görülmemektedir. Son konaklarda etken teşhisi için dışkı muayenesi, arekolin pürgasyon yöntemi, kan serumunda spesifik antikor taranması ve dışkıda antijen aranması gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir. Son konakta teşhis yöntemleri içerisindeki en güvenilir tanı yöntemi nekropsidir (37). İnsanlarda ise tanıda ultrasonografi (USG), radyografi, bilgisayarlı tomografi (BT), X-ray (röntgen), manyetik rezonans görüntüleme (MR) gibi birçok görüntüleme sistemi kullanılmaktadır. Görüntüleme yöntemleri ile birlikte İmmun Floresan Antikor Tekniği (IFAT), Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), Western Blot (WB) ve İndirekt Heamaglutinasyon Testi (IHA) gibi birçok serolojik yöntem ve Polymerase Chain Reaction (PCR) tabanlı moleküler yöntemler de kullanılmaktadır (37). İnsanlarda KE teşhisinde bahsedilen görüntüleme yöntemleri çok sık bir şekilde kullanılmakta olup, hayvanlarda ise teşhis için görüntüleme sistemleri nadiren kullanılmaktadır (38).

3.8. Kistik Ekinokokkozis'in Tedavisi

KE'in tedavisi son konaklarda erişkin parazitlere, ara konaklarda ise parazitin larva formuna yönelik uygulamaları içermektedir. *Echinococcus* spp. enfeksiyonlarında son konaklarda sağaltım yapılması, hastalığın insanlara geçişinin önlenmesi bakımından oldukça önemlidir. Ara konak hayvanlarda tedavi, tanıdaki

zorluklar ve ekonomik olmaması sebebiyle tercih edilmemektedir (39).

Son konak olan hayvanların kistli doku ve organlara erişiminin engellenmesi ve aynı zamanda belirli aralıklarla tedavi edilmesi, etkenin ara konaklara tekrar bulaşmasının önüne geçilmesi bakımından oldukça önem arz etmektedir. Arekolin hidrobromid uygulaması son konakların kontrolü amacıyla uzun yıllar boyunca aktif bir şekilde kullanılmıştır (40). Praziquantel etken maddesi köpeklere oral veya subkutan enjeksiyon yollarıyla uygulanabilmektedir. Praziquantel bahsedilen uygulama yolları ile kullanıldığında, *E. granulosus* ve *E. multilocularis* türlerine karşı oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (41).

3.9. Kistik Ekinokokkozis’de Korunma ve Kontrol

KE ile mücadelede koruma ve kontrol için bazı stratejiler ve tedbirler gerekmektedir. Bu stratejiler için en temel ve gerekli kurallardan birisi hijyenik tedbirlerdir. Halk sağlığı ile ilgili eğitimler verilmesi, son konakların takibi, kayıt altına alınması ve düzenli aralıklarla antelmintik ilaçlar kullanılarak tedavi edilmesi, sokak köpeklerindeki popülasyonun kontrol altına alınması, kesimhanelerin düzenli ve rutin denetimlerinin yapılması, kasaplık hayvanlarda yetiştirilme ortamlarının düzenlenmesi ve denetimi, son konak hayvanların hidatik kist ile enfekte doku ve organlara erişiminin engellenmesi, enfekte doku ve organların usulüne uygun şekilde imhası etkenle mücadelede önemli tedbirler olarak görülmektedir (42-44). KE’den korunmak ve hastalığın kontrol altına alınması amacıyla yapılan en önemli çalışmalardan birisi de aşı geliştirme çalışmalarıdır. Parazitin çiftlik hayvanlarındaki *E. granulosus* s.s. ile enfeksiyonunu önleyebilen EG95 adlı bir aşı geliştirilmiştir (45; 46). Aşının saha

denemeleri, doğal koşullar altında koyunlarda hidatik kist oluşumunu %95 oranında azalttığını göstermiştir (47; 48).

3.10. Kistik Ekinokokkozis'in Dünya'daki Moleküler Epidemiyolojisi

Herhangi bir bulaşıcı hastalığın epidemiyolojisi düşünüldüğünde, etiyojisini anlamak esastır. Ekinokokkozis enfeksiyonlarında da, birçok endemik alanda, farklı konak türleri enfeksiyona dahil olduğundan, enfeksiyondaki süreç ve bulaşmadaki rollerin iyi belirlenmesi gerekmektedir. Hali hazırda *Echinococcus* cinsi içerisinde birden fazla tür veya suş/genotip olduğu düşünülürse enfeksiyonun epidemiyolojisindeki dinamiklerin belirlenebilmesi için daha çok veriye ihtiyaç duyulmaktadır (3). Moleküler epidemiyoloji (ME), *Echinococcus* cinsi içinde sergilenen kapsamlı genetik ve fenotipik varyasyonun anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır (3; 49). Bu durum, biyolojik verilerle desteklenen sağlam bir taksonominin (Tablo 1) oluşturulmasına, epidemiyolojik araştırmalar için uygun moleküler araçların geliştirilmesine ve bulaşma modellerinin aydınlatılmasına önemli katkılar sağlamıştır. Moleküler araçlar temel olarak PCR tabanlı yaklaşımları, mitokondriyal ve nükleer DNA dizilimlerini içermektedir (50; 51).

3.11. *Echinococcus* Türlerinin Taksonomisi ve Genotipleri

E. granulosus esas olarak çiftlik hayvanlarını içeren yaşam döngüsünde korunmakta, Avustralya gibi bazı bölgelerde ise yaban hayatına yayılım gösterebilmektedir. Moleküler yöntemler, bu gibi durumlarda türlerin metasestod aşamalarında tanımlanmasına katkı sağlamaktadır (52).

Bolivya'da yakın zamanda yapılan bir çalışmada, koyun ve sığırlarda sırasıyla *E. granulosus* ve *E. ortleppi*'nin varlığı bildirilmiştir (53). *E.*

granulosus'un bulaşmasında arakonak olan sığırların çok az rol oynadığı bildirilmesine rağmen, Sudan ve Etiyopya'daki son ME çalışmaları sığırların epidemiyolojik olarak *E. granulosus* ve *E. ortleppi*'nin bulaşmasında en önemli ara konak olduğunu göstermektedir (54; 55).

G8 ve G10, *E. canadensis* türünün varyantları olarak bilinmektedir (3; 56; 57). DNA dizi analizleri ile G6 ve G7 izolatlarının, G8 ve G10'un yaban hayatı izolatlarından farklı olduğu, hatta G8 ve G10 izolatlarının dahi birbirinden oldukça farklı olduğu belirlenmiştir (58).

E. canadensis'in her iki genotipi de esas olarak Kuzey Amerika ve İskandinavya'daki yaban hayatında bulunan kurt ve geyiklerle sınırlı olup, bazen insanları enfekte etmektedir (8). Quebec ve Maine'deki yabani kanidelerde *E. canadensis* üzerine yapılan bir çalışmada, yazarlar hem kurtların hem de çakalların *E. canadensis* için son konaklar olmasına rağmen, çakalların kentsel yeşil alanları kirletme olasılığının kurtlardan daha yüksek olduğunu saptamışlardır (59). Son on yılda yapılan çalışmalar, Avrupa, Asya, Kuzey Amerika ve Çin'den gelen *E. multilocularis* izolatları arasında çok sayıda genetik çeşitlilik olduğunu göstermiş ve bu genetik çeşitlilik literatürde Avrupa, Asya, Moğol ve Kuzey Amerika varyantı olarak bildirilmiştir (3; 49; 60). Avrupa'daki *E. multilocularis* türünün Kuzey Amerika'daki yerli silvatik türlerinden daha öldürücü olabileceğini bildiren bir çalışma bulunmaktadır (8).

Tablo 1. *Echinococcus* spp.'nin güncel taksonomisi (61).

Türler	Tür / Genotip	Bilinen Ara Konaklar	Bilinen Son Konaklar	İnsanlara Enfektivitesi (Evet/Hayır)	Hastalık
<i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i>	G1	Koyun (sığır, domuz, deve, keçi, makropod)	Köpek, tilki, dingo, çakal, sırtlan	Evet	KE
	G3	Manda, sığır	Köpek, tilki?	Evet	KE
<i>E. equinus</i>	G4	At, eşek, katır, zebra ve diğer tek tırnaklılar	Köpek, arslan	Evet	KE?
<i>E. ortleppi</i>	G5	Sığır, diğer tırnaklı hayvanlar	Köpek	Evet	KE
	G6	Deve, keçi	Köpek	Evet	KE
<i>E. canadensis</i>	G7	Domuz	Köpek	Evet	KE
	G8	Geyik	Köpek, kurt	Evet	KE
	G10	Geyik	Köpek, kurt	Evet	KE
<i>E. felidis</i>		Yaban domuzu, su aygırı	Arslan	Henüz bilinmiyor	-
<i>E. multilocularis</i>		Kemirgenler, insan, lagomorflar	Tilki, köpek, kurt	Evet	AE
<i>E. shiquicus</i>		Pika ve kemirgenler	Tibet tilkisi	?	?
<i>E. oligarthra</i>		Kemirgenler	Yabani kedigiller	Evet	PE
<i>E. vogeli</i>		Kemirgenler	Çalı köpeği	Evet	PE

G1 genotipinin koyunlarda en yaygın genotip olduğu, G2 genotipinin ilk olarak “Tazmanya koyunu suşu” olarak tanımlandığı, ancak G2 genotipinin aslında kozmopolit olan G3 manda suşunun bir mikro varyantı olarak kabul edildiği bildirilmektedir. G9 genotipinin artık ayrı bir genotip olarak tanınmadığı, bu genotipin muhtemelen G7'nin bir mikro varyantı olduğu belirtilmektedir (61). *E. granulosus*, insanlarda ve ara konak olan hayvanlarda KE'e neden olan en yaygın türdür (3; 49; 61). *E. canadensis*'in dünya çapında insanlarda görülen KE vakalarının ikinci en önemli sorumlusu olduğu belirtilmektedir (61). *E. canadensis* türü içerisinde ayrı türlerin tanımlanması önerilmiş ancak bu öneri henüz kabul edilmemiştir (62).

3.12. Türkiye’de Yapılan Moleküler Epidemiyoloji ve Genotiplendirme Çalışmaları

Türkiye’de *E. granulosus*’un genotiplerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, Elazığ, Erzurum, Diyarbakır ve Malatya illerinden toplanan 179’u koyun, 19’u sığır, 7’si keçi, 1’i deve ve 1 örneği de insan orjinli kistlerden oluşmak üzere toplam 207 hidatik kist örneği incelenmiştir. Yine aynı çalışmada bir köpekten alınan erişkin *E. granulosus* örneği diğer örneklerle birlikte moleküler olarak tanımlanma yapılması amacıyla ribozomal Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1) gen bölgesinin Polymerase Chain Reaction-Restriksiyon Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ve Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (mt-CO1) gen bölgesine yönelik sekans analizleri yapılmış ve tüm örneklerin genotipinin yaygın koyun suşu olan (G1) olduğu belirlenmiştir (63).

Ölü bulunan bir yaban koyununa (*Ovis gmelinii anatolica*) yapılan nekropsi işleminin ardından, hidatik kist ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Yaban koyunundan alınan hidatik kist örneği ülkemizde ilk kez mt-CO1 gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak PCR ve sekans analizi ile *E. granulosus* yaygın koyun suşu (G1) olduğu belirlenmiştir (64).

Manisa ve İzmir illerindeki mezbahalarda kesimi yapılan 12 koyundan alınan hidatik kist örnekleri ile hidatik kist ile enfekte insanlardan, ameliyat sonrası alınan 10 hidatik kist örneği mt-CO1, atp6, nad1, rrnS gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak PCR ve sekans analizlerine tabi tutulmuş, 10 koyun ve 9 insan izolatında G1-G3 genotipini, 2 koyun ve 1 insan izolatında ise domuz suşu

(G7) genotipi belirlenmiştir. Tespit edilen G7 genotipinin (domuz suşu) Türkiye’de ilk bildiriimi olduğu raporlanmıştır (65).

Türkiye’de farklı illerden toplanan 12 sığır ve 100 koyun izolatu, mt-CO1 gen bölgesine yönelik yapılan PCR ve DNA dizi analizleriyle incelenmiş, analizler neticesinde 9 sığır ve 98 koyun izolatuının G1 suşu, 3 sığır ve 2 koyun izolatuının ise G3 suşu olduğu belirlenmiştir (66).

E. granulosus’ta haplotip belirlenmesi amacıyla yapılmış olan bir diğler çalışmada, 39 fertil koyun izolatuında etkene ait protoskoleksler, *E. granulosus* actin genlerine spesifik primerler kullanılarak PCR ve sekans analizlerine tabi tutulmuş ve EgactI geninin EgactII genine kıyasla daha polimorfik bir yapıda olduğu belirlenmiş ayrıca EgactI geninin üç adet allel gen içerdği tespit edilmiştir. Parsiyal EgactI geninin 6. pozisyonunda örneklerin tamamında nükleotid değışikliği olduğu belirlenmiş ve bu belirlenen değışiklik araştırmacılar tarafından Anadolu haplotipi olarak isimlendirilmiştir (67).

KE ile enfekte bir attan elde edilen hidatik kist izolatuının genotipinin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, araştırmacılar izolatu mt-CO1 gen bölgesine yönelik PCR ve takiben DNA sekans analizlerine tabi tutmuşlar ve analizler sonucunda at orjinli izolatuın *E. granulosus* s.s. (G1-G3) olduğunu tespit etmişlerdir (68). Akciğlerlerinde hidatik kist olduğu belirlenen bir dağ keçisinde, hidatik kist izolatuı PCR ve DNA sekans analizleri ile incelenmiş ve analizler sonucunda, dağ keçisi orjinli hidatik kist izolatuın genotipinin *E. granulosus* s.s. (G1) olduğu bildirilmiştir (69).

Kırıkkale’de 24 koyundan alınan hidatik kist örneğinde etkenin moleküler karakterizasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir araştırmada, Random

Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR ile koyun izolatları incelenmiş ve tüm örneklerin G1 suşu olduğu bildirilmiştir (70).

Mandalarda KE'in prevalansının ve moleküler karakterizasyonunun belirlenmesi amacıyla Karadeniz bölgesinde yapılan bir araştırmada, toplam 9 manda izolatu incelenmiştir. İnceleme sonucunda izolatların 6'sının yaygın koyun suşu (G1), 3'ünün ise *E. granulosus* s.s. (G1-G3) olduğu bildirilmiştir (71).

Elazığ'da katır izolatu üzerinde yapılan bir araştırmada, katırın karaciğerinde bulunan hidatik kist izolatının *E. equinus* (G4) olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile Türkiye'de katırlarda ilk G4 suşunun raporlandığı bildirilmiştir (72).

KE olduğu histolojik analizlerle doğrulanmış, 70 insan örneği üzerinde yapılan bir çalışmada, parafine gömülü bloklardan alınan kesitlerden, DNA izolasyonları, 12S rRNA geni hedef alınarak PCR testleri ve mt-CO1 geni hedef alınarak yapılan sekans analizleriyle genotiplendirme çalışmaları yapılmıştır. PCR ile 12S rRNA geni hedef alınarak yapılan analizler sonucunda 70 örneğin 26'sının *E. granulosus* s.s. (G1-G3) olduğu belirlenmiştir. mt-CO1 gen bölgesi hedef alınarak yapılan DNA sekans analizleri ile inceleme neticesinde geriye kalan 44 örnekten, bir örneğin G3 suşu ve iki örneğin G6 suşu olduğu tespit edilmiştir (73).

İstanbul'da yapılan bir çalışmada, 46 insan izolatu, genotipik karakterizasyonlarının belirlenmesi amacıyla mt-CO1 gen bölgesi hedef alınarak DNA dizi analizlerine tabi tutulmuş ve analizler sonucunda, tüm izolatların yaygın koyun suşu (G1) olduğu belirlenmiştir (74).

Türkiye'nin farklı illerine ait genotiplendirme çalışmaları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden bildirilen *E. granulosus* suşları.

Şehir	İzolasyon (Sayı)	Hedeflenen gen bölgesi / Metot	Suş (Genotip)	Kaynak
Elazığ, Erzurum, Malatya, Diyarbakır, Van, Şanlıurfa	Koyun (179), Sığır (19), Keçi (7), Deve (1), Köpek (1), İnsan (1)	PCR-RFLP, mt-CO1 sekans analizi	G1	(63)
Malatya	Yaban koyunu (1)	mt-CO1 sekans analizi	G1	(64)
İzmir, Manisa	Koyun (12), İnsan (10)	atp6, nad1, rrnS, mt-CO1 sekans analizi	G1, G7	(65)
Türkiye'nin farklı illeri	Koyun (100), Sığır (12)	mt-CO1 sekans analizi	G1, G3	(66)
Erzurum	Sığır (220)	12S rRNA-PCR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	(75)
Konya	Koyun (39)	Actin-PCR	G1 (Anadolu haplotipi)	(67)
Elazığ, Erzurum	Koyun (31), Sığır (23)	CO1-PCR SSCP	G1-G3	(76)
Elazığ	İnsan (70)	12S rRNA-PCR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3, G6	(73)
Ankara	At (1)	12S rRNA-PCR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	(68)
Antalya	Dağ keçisi (1)	12S rRNA-PCR, mt-CO1 sekans analizi	G1	(77)
Kırıkkale	Koyun (24)	RAPD-PCR	G1	(70)
Kırıkkale	Sığır (20)	12S rRNA-PCR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	(78)
İstanbul	İnsan (46)	mt-CO1, sekans analizi	G1	(74)
Karadeniz bölgesi	Manda (9)	PCR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	(71)
Trakya	İnsan (42), Sığır (13), Koyun (3)	PCR-RFLP, PCR-SSCP, mt-CO1 sekans analizi	Koyun (G1) İnsan (G1, G7)	(79)
Kilis	Koyun (19)	12S rRNA-PCR, rrnS, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	(69)
Manisa	Sığır (18)	mt-NAD1 mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	(80)
Elazığ	Katır (1)	12S rRNA-PCR, mt-CO1 sekans analizi	G4	(72)
Elazığ	Koyun (4), Sığır (4)	12S rRNA-PCR, mt-CO1 sekans analizi	G3	(81)
Elazığ	Koyun (3), Sığır (1)	12S rRNA-PCR, mt-CO1 sekans analizi	G1, G3	(51)
Elazığ	Koyun (31), Sığır (38)	12S rRNA-PCR, nad1, mt-CO1 sekans analizi	E.g.s.s. (G1)	(82)
Malatya	İnsan (53)	mt-CO1, PCR sekans analizi	G1-G3	(83)
Elazığ	Sığır (40)	mt-CO1, PCR sekans analizi	G1-G3, G6/G7	(84)
Elazığ	Sığır (66), Koyun (19)	mt-CO1, PCR sekans analizi	G1-G3, G6/G7	(85)
Elazığ	Sığır (60)	mt-CO1, PCR sekans analizi	G1, G3	(86)
Elazığ	İnsan (17)	mt-CO1, PCR sekans analizi	G1-G3, G6/G7	(87)

3.13. *Echinococcus granulosus*'ta microRNA Çalışmaları

Echinococcus granulosus genotiplerinin, belirli bir ara konakta fertil kistler oluşturabildiği, ancak bazı suşların spesifik olmayan konaklara da bulaşabildiği, çoğunlukla bu konaklarda steril kistler oluşturduğu bildirilmektedir (88). *E. granulosus* s.s. koyunlarda çoğunlukla fertil kist oluştururken, sığır, domuz, keçi, deve ve insanlarda kist fertilitésinin koyunlara göre daha düşük oranlarda olduğu belirlenmiştir (89). Yine *E. canadensis* (G7 genotipi) daha çok domuzlardan izole edilmekle birlikte insanlarda da izole edilmiş ve sıklıkla kistlerin beyinde geliştiği gözlemlenmiştir (88-90). Tüm bu özellikler *E. granulosus* s.l.'nin gelişim süreçlerini anlamak açısından önemlidir. KE hastalığının kontrolü için yeni stratejilerin oluşturulmasında bu bilgilerin değerli olabileceği düşünülmektedir (91).

E. granulosus'ta konak ve parazitin birlikte yaşamasının altında yatan mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır. Son 30 yıldaki deneysel çalışmaların çoğunluğu, parazitlerin konaklarındaki hayatta kalma stratejilerini belirlemeye yöneliktir (92). *E. granulosus* ve diğer ilgili parazitlerin gelişiminde yer alan mekanizmalara ışık tutabilecek en yeni yaklaşım small RNA'lar olup, özellikle mikroRNA'lar tarafından gen ekspresyonunun düzenlenmesi, bu konudaki güncel yaklaşımlar olarak görülmektedir (93).

Echinococcus spp. genomunun yaklaşık %10-14'ünü protein kodlayan genler (exon) oluştururken, diğer genler non-coding (intron) RNA'lar olarak kopyalanırlar (94; 95). Non-coding RNA'lar moleküler ağırlıklarına göre iki tipe sınıflandırılmaktadır. Bunlardan birincisi miRNA'lar, ortalama 18-24 nükleotid uzunluğunda olup, bu kısa RNA'ların uzunluğu <200 nt'dir. Diğerisi ise 200 nt'den

daha uzun olan kodlayıcı olmayan RNA'lar (Long non-coding RNAs- LncRNA)'dır (96; 97). Daha önce yapılan çalışmalar, non-coding RNA'ların ökaryotlarda fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller oynadığını göstermiştir (98). miRNA'lar ve LncRNA'ların, *E. granulosus*, *E. multilocularis* ve *E. canadensis* gibi türlerde de bulunduğu bildirilmiştir (99).

miRNA'lar protein translasyonunu inhibe ederek veya hedef transkriptlerin stabilitesini bozarak gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenleyen küçük (18-24 nt) kodlayıcı olmayan (non-coding) RNA'lardır (100). miRNA'ların konakçı-patojen etkileşimi ve konakçı bağışıklık tepkilerinin mikroorganizmalara karşı aktif bir rolü olduğu belirlenmiştir (101). miRNA'lar, hematopoez, bağışıklık yanıtı ve inflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda miRNA'ların, çeşitli fare modellerinde hem doğuştan hem de uyarlanabilir bağışıklık tepkilerinin önemli düzenleyicileri olarak işlev gördükleri saptanmıştır (102-104). Ayrıca maligniteler ve bağışıklık yanıtı ile ilişkili hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde de rol almaktadırlar (105; 106). Son çalışmalar, hem parazit hem de konak kökenli dolaşımdaki miRNA'ların, helmint enfeksiyonları olan insanların ve hayvanların kanında veya sıvılarında belirlendiğini göstermiştir (107). Bu nedenle, parazit enfeksiyonunun veya ilgili hastalıkların erken tanısı için potansiyel biyo-belirteçler olarak görülmektedirler (108). *Echinococcus* türlerinde tanımlanan miRNA'ların, konak-parazit etkileşimindeki rolleri ve gelecekteki potansiyel tanı amaçlı hedef kullanımları açısından önemli olacağı bildirilmektedir (109; 110).

miRNA'lar, hem hayvanlarda hem de bitkilerde hemen hemen tüm hücresel sinyal yollarının transkripsiyon sonrası regülasyonunda yer alan küçük fakat güçlü, düzenleyici RNA'lardır (80). Yaklaşık 2 ile 7 nükleotid arasında uzunluğa

sahip olan miRNA'nın dizisi, hedef çifti tamamlayıcılığı yoluyla hedef mRNA'ların, LncRNA'ların ve dairesel RNA'ların (Circular RNA-circRNA) tanınması için en önemli bölge olarak tanımlanmıştır (111; 112). *Echinococcus* türlerinde yaygın olarak eksprese edilen birtakım miRNA'lar tanımlanmıştır (113). Parazit bağırsağa ulaştığında, parazitin ortolog proteinleri ve miRNA'ları, konak hücrelerine transfer edilmekte ve burada parazitik formları üretmek için adaptasyona uğramaktadırlar (114-116). Bu nedenle miRNA'ların, helmint-konak etkileşimi ile ilgili anahtar düzenleyici faktörler olabileceği belirtilmektedir (107). İnterjenik miRNA'ların transkripsiyonu, orijinal genlerin farklı hücre tiplerinde, dokularda, gelişim evrelerinde genişleyen hedeflere tercih edilmesine bağlıdır ve parazitlerdeki ana biyofonksiyonel yollardan biridir. Bu gözlemler, miRNA'ların *Echinococcus* spp. ve KE'de önemli olduğunu ve bu nedenle tanı veya tedavi hedefleri olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (99).

LncRNA'lar, circRNA'lar ve miRNA'ların hücredeki mekanizmaları kısaca şöyle özetlenebilir:

1. LncRNA: LncRNA'lar, siRNA'lar (small interfering RNAs), miRNA'lar ve Piwi-interacting RNAs (piRNAs)'ın kaynağı gibi hizmet ederek, polipeptidlere dönüştürülür, bu sayede LncRNA'lar sinyal molekülleri, tuzakları, kılavuzları ve yapı iskeletleri gibi hareket ederek sitoplazmada önemli biyolojik roller oynarlar (112).

2. circRNA: circRNA'lar genomik DNA'dan kopyalanır ve çok sayıda biyolojik işlevi yerine getirmek için sitoplazmaya taşınır. circRNA'lar, türetilmiş pseudogenlerin, sponge proteinlerinin ve miRNA'ların polipeptidlere dönüştürülmesini sağlar (117).

3. miRNA: pre-miRNA, çift sarmallı bir RNA hairpin ve çekirdekte bir stem-loop yapısı ile genomik DNA'dan kopyalanır (100; 118). Olgun miRNA; miRNA, Dicer, AGO (RNA-binding protein Argonaute - RNA bağlayıcı protein Argonaute) ve TRBP (TAR-RNA-binding protein - TAR-RNA bağlayıcı protein) etkilerinin sonucu olarak, RISC'e (RNA-induced silencing complex- RNA kaynaklı susturucu kompleksi) yüklenebilir (119). LncRNA'lar, mRNA'lar, circRNA'lar ve psödogenlerin çevrilmemiş bölgelerindeki komplementer sekansları, mRNA ve miRNA bölünmesinin transkripsiyonel baskısı ve degradasyonu ile sonuçlanan miRNA'lara rekabetçi bir şekilde (Competing endogenous RNA (CeRNA) bağlanabilirler (119).

Genellikle intergenik bölgede bulunan miRNA genleri, RNA polimeraz II tarafından birincil miRNA'lar (pri-miRNAs) adı verilen yapılarına kopyalanır. Hücre çekirdeğinde Drosha ve Pasha tarafından prekürsör miRNA'lara (pre-miRNA) işlenir. Hücre çekirdeğinden sitoplazmaya dışa aktarılmasından sonra, diğer kofaktörlerle birlikte Dicer işlemeden dolayı ~22 nt uzunluğunda dupleks yapı oluşur. Olgun miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3' ucundaki Untranslated region bölgesindeki seed dizilerini tanırlar ve hedef mRNA'ların transkripsiyonel baskılanmasına veya mRNA degradasyonuna neden olur (119).

Echinococcus spp. türlerinin gelişimi ve parazitliğinde önemli roller oynayabileceği düşünülen yüksek oranda korunmuş 87 adet miRNA bildirilmiştir (93; 120). Bugüne kadar *Echinococcus* etkenlerinde tanımlanan ve aday olan miRNA'lara ait bildirimler Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. *Echinococcus* spp.'de eksprese olan miRNA'lar (99).

Tür	Doku	Konak	Genotip	Tanımlanan miRNA'lar	Teknoloji	Ülke
<i>E. granulosus</i>	Protoskoleks	Domuz karaciğer, Sığır akciğer	G1	34 korunmuş ve 4 yeni miRNA adayı	Sanger	Arjantin ve Uruguay
	Protoskoleks	Domuz	G7	miR-125, miR-2, miR-71, miR-9, miR-10, let-7 ve miR-277		
	Protoskoleks	Koyun	G1	miR-125, miR-2, miR-71, miR-9, miR-10, let-7 ve miR-277		
	Germinal membran	Fare	G1	miR-2, miR-71, miR-9, miR-10, let-7 ve miR-277		
	Pre-mikrokistler	Domuz karaciğer, Sığır akciğer	G7	miR-125, miR-2		
	Mikrokistler	Domuz karaciğer, Sığır akciğer	G7	miR-71		
	Protoskoleks	Koyun karaciğer	-	109 bilinen ve 260 yeni miRNA	Illumina HiSeq TM 250	Çin
	Kist membranı	Koyun karaciğer	-	46 bilinen miRNA ve 92 yeni olgun miRNA	Illumina Genome Analyzer II	Çin
	Protoskoleks	Koyun karaciğer	-	45 bilinen miRNA ve 91 yeni olgun miRNA		
	Erişkin parazit	Köpek	-	45 bilinen miRNA ve 103 yeni olgun miRNA		
Protoskoleks	Koyun karaciğer	G1	36 miRNA			
<i>E. canadensis</i>	Protoskoleks	Domuz karaciğer	G7	35 miRNA	Illumina Genome Analyzer II	Çin
	Kist duvarı	Domuz karaciğer		35 miRNA		
	Kist duvarı	Domuz karaciğer		42 miRNA		
<i>E. multilocularis</i>	Metasestod	Dişi fare	-		small RNA sequencing	Arjantin
	Metasestod	Makak	-	24 miRNA	Selforganizing map analysis	Almanya

E. granulosus s.s.'nin bilinen korunmuş 76 miRNA'sı arasında en yüksek ekspresyon seviyelerine miR-2, miR-71 ve miR-125 sahiptir (93; 120). İlginç bir şekilde, miR-124b ve miR-87 ekspresyon seviyeleri, olgun miRNA'lardan daha yüksektir, bu da gelişme sırasında efektör olarak hareket ettiklerini ve karşılık gelen miRNA'ların türevlerinin iki farklı düzenleyici small RNA ürettiğini göstermekte ve buna ek olarak miRNA'ların doku ve faza özgü ekspresyon sergilediğine işaret etmektedir (93).

miR-277, let-7, miR-71, miR-10, miR-2 ve miR-9, G1 ve G7 genotipinin sekonder kist hidatik kist duvarlarında ve protoskolekslerinde spesifik olarak eksprese edilirken, miR-125 sadece protoskolekslerde ve pre-microcystlerde saptanmıştır. Ek olarak, üç miRNA'nın (let-7, miR-71 ve miR-2) protoskolekslerde yüksek seviyelerde eksprese edildiği bildirilmiştir (93). let-7'nin, protoskoleks ve kist duvarında, *E. granulosus*'un iki yönlü gelişim yetenekleri ile ilişkili olabilen önemli ölçüde artan bir ekspresyon sergilediği belirtilmiştir (120). Ayrıca, benzimidazolün in-vitro maruziyetinde *E. granulosus* miRNA'larından let-7 ve miR-61 ekspresyon düzeylerinin mikrokist aşamasında önemli ölçüde etkilendiği; bununla birlikte, bu miRNA'ların ekspresyonunun, diğer gelişim evrelerinde albandazol sülfoksite yanıt olarak farklı değişiklikler sergilediği bildirilmiştir (121).

Echinococcus türlerinde yüksek oranda eksprese edilen, ancak omurgalı konakta eksprese edilmeyen miRNA'lar, konak homolog miRNA'larından sapsmış olabilir. Örneğin, bantam, miR-71 ve miR-277'ye spesifik diagnostik markerlar, müdahale stratejileri için aday hedefler olarak değerlendirilebilir (110).

Yüksek verimli sekanslama ve miRNA microarray analizleri, doğal

konaklarda ve hayvan modellerindeki var olan parazit enfeksiyonu sırasında, ilgili hücrelerde, dokularda ve kanda patojen challenge'larına karşı konak yanıtlarında miRNA'lar tanımlanmıştır (95; 122; 123). Son yapılan çalışmalar, miRNA ve LncRNA'lar dahil olmak üzere dolaşımda olan non-coding RNA'ların, *E. granulosus* ve *E. multilocularis* ile enfekte olmuş konakların kanında stabil olarak tespit edilebildiğini göstermiştir (122-124). Dolaşımdaki bu non-coding RNA'ların, konak-parazit etkileşimi, gelişimi ve büyümesindeki rollerinin anlaşılmasına yarayabileceği, potansiyel olarak tanı hedefleri ve terapötik adaylar olarak hizmet edebileceği ileri sürülmüştür (99).

miRNA ve LncRNA profilleri, konak *E. granulosus* ile enfekte olduğunda değişmektedir. Ara konağın bağırsağı, *Echinococcus* spp. yumurtalarına karşı konak savunmasının ilk direnç noktası olarak sürecin ayrılmaz bir parçasıdır. Nitekim KE'e dirençli koyunlarda, KE'e dirençli olmayan koyunlara göre, özellikle miR-27a, miR-542-5p, miR-671, miR-134-5p, miR-21-3p ve miR-26b'nin önemli ölçüde daha yüksek oranlarda eksprese edildiği bildirilmiştir (125). Dolayısıyla, KE'e dirençli olan ve olmayan koyunlarda bulunan miRNA'ların ekspresyonunun, bağırsak dokusunun *E. granulosus* yumurtalarına yanıtında anahtar olabileceği bildirilmiştir (99).

E. granulosus s.l. genotip ve/veya türlerinin belirlenmesi KE kontrolü ve epidemiyolojisi bakımından büyük önem arz etmektedir. Nükleik asit sekanslarındaki farklılıklar, *E. granulosus* s.l.'nin tür içi varyasyonlarını oluşturmakta, parazitin yaşam döngüsünü, gelişim hızını, konak özgüllüğünü, geçiş dinamiklerini, patojenitesini, kemoterapötik ajanlara duyarlılığını ve antijenitesi ile birlikte, hastalığın kontrol ve epidemiyolojisini de etkileyebilmektedir (31; 126).

Aktif ve inaktif KE olduğu çeşitli analizlerle tespit edilen insanların periferal kanında lenfositlerin ve diğer bağışıklık hücrelerinin işleviyle ilgili 84 adet miRNA'nın ekspresyon profillerini araştırmak amacıyla, miRNA PCR array teknolojisi kullanarak bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 10 aktif (KE3b aşaması) ve 10 inaktif (KE4-KE5 aşaması) kisti olan 20 hastadan kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinden total miRNA ekstraksiyonu yapılmış, elde edilen RNA'lara RT-PCR yöntemi uygulanarak RNA örnekleri cDNA'ya dönüştürülmüştür. Sonrasında cDNA örneklerine miRNA PCR array testi uygulanmıştır. Aktif kistleri olan hastalarda, sekiz adet miRNA'nın (let-7g-5p, let-7a-5p, miR-26a-5p, miR-223-3p, miR-26b-5p, miR-195-5p, miR-16-5p ve miR-30c-5p) aktif olmayan hastalar ile karşılaştırıldığında daha yüksek seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir. Aktif kistleri olan hastalarda bu miRNA'ların yüksek ekspresyonunun tespit edilmesinin, konak bağışıklık yanıtında bu miRNA'ların enfeksiyona karşı spesifik rollerinin olduğunu gösterir bir kanıt olabileceği düşünülmüştür (92).

İnsanlarda AE ve KE hastalarında bağışıklık sistemini oluşturan T ve B hücrelerini aktive eden miRNA profilini araştırmak için yapılan bir çalışmada, Kilis Devlet Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nda AE ve KE'li hastalardan toplam 50 karaciğer dokusu örneği materyal olarak kullanılmıştır. miRNA'ları, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri içinde istatistiksel olarak hesaplanan nicel bir Real Time PCR reaksiyonu ile analiz edilmiş ve miRNA'lar arasındaki kat değişiklikleri, $P < 0.05$ 'in anlamlı olduğu kabul edilen Welch T testi ile değerlendirilmiştir. Yirmi beş adet miRNA'nın (let-7a-5p, let-7c, let-7e-5p, miR-15b-5p, miR-223-3p, miR16, miR-17-5p, miR-23a-5p, miR-24-3p, miR-30c-5p, miR-25-3p, miR-26a-3p, miR-26b-

3p, miR-29b-3p, miR-98-5p, miR-29c-3p, miR-30a-5p, miR-30b-5p, miR-30d-5p, miR-222-3p miR-30e-5p, miR-142-5p, miR-106b-5p, miR-125b-5p ve miR-101-3p) AE ve KE olan hastalardaki ekspresyon düzeylerinin, kontrol gruplarına göre aşağı regüle olduğu saptanmıştır. On iki adet miRNA'nın (miR-15a-5p, miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-365-3p, miR-146a-5p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-181d, miR-214-3p, miR-195-5p ve miR-181c-5p) ekspresyon düzeylerinin ise AE ve KE hastalarında, sağlıklı kişilere göre yukarı yönlü regüle olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile hem AE hem de KE'in progresyonunun T ve B hücre aktiviteleri ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (127).

Helminthlerin genetik yapısı ve miRNA profilinin, albendazol sülfoksit tepkilerini etkilediği bilinmektedir. *E. granulosus*'un monofazik ve difazik ortamlarda in-vitro olarak kültürlemiş farklı gelişim evrelerinde miRNA'ların ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Albendazol sülfoksit maruz kalan, hem albendazol sülfoksit ile tedavi edilen hem de kontrol grubu parazitlerde miRNA'lar, mikrokistlerden, sağlam protoskolekslerden, bir ve üç segmentli strobilasyona uğramış erişkin parazitlerden ekstrakte edilmiştir. let-7 ve miR-61'in ekspresyon seviyesi, her aşama için Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR) kullanılarak değerlendirilmiştir. Farklı ilaç konsantrasyonlarında hem let-7 hem de miR-61'in anlamlı farklı ekspresyon düzeyi gösterdiği belirlenmiştir. Albendazol sülfoksit maruz bırakılan *E. granulosus*'un strobilasyona uğramış ve metasestod evreleri arasında let-7 ekspresyonunda önemli bir fark olduğu belirlenmiştir. Albendazol sülfoksit (1000 µg/ml) uygulanan protoskolekslerde, let-7 ekspresyonu önemli ölçüde azalma gösterirken, aynı gruptaki erişkin parazitlerde bu miRNA'nın daha yüksek seviyelerde ekspresyon gösterdiği kaydedilmiştir. Farklı ilaç

konsantrasyonlarına maruz bırakılan mikrokistlerde, miR-61 ekspresyonunda önemli bir azalma görüldüğü, ayrıca, bir segmentli strobilasyona uğramış erişkin parazitlerde ve protoskolekslerde miR-61 ekspresyonunda önemli bir artış tespit edilmiştir. Yüksek ilaç konsantrasyonu veya protoskolekslerin albendazol sülfoksite uzun süreli maruz kalması sonucu, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha yüksek miR-61 ekspresyonu saptanmıştır. Araştırmacılar, in-vitro benzimidazol maruziyeti altında *E. granulosus* let-7 ve miR-61 miRNA'sının ekspresyon düzeylerinin mikrokist aşamasında önemli ölçüde etkilendiğini belirtmiştir. Bu çalışmanın, platihelminlerde benzimidazolün miRNA ekspresyonu üzerinde etkilerinin olduğuna dair ilk kanıt olduğu bildirilmektedir (121).

Alveolar Ekinokokkozise sebep olan *E. multilocularis*'in miRNA'larının in-vitro metasestod gelişimi boyunca ekspresyon profillerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, miR-71'in spatial ekspresyonu belirlenmiş ve miRNA hedefleri tahmin edilmiştir. *E. multilocularis*'in farklı örneklerinden küçük cDNA kütüphaneleri sekanslanmış, *E. multilocularis*'teki 37 miRNA'nın ekspresyonunun incelenmesi neticesinde, miR-71 gibi bazı miRNA'ların konakta bulunmadığı doğrulanmıştır. Analiz edilen tüm yaşam döngüsü aşamalarında yüksek oranda eksprese edilen birkaç miRNA'nın olduğu, miRNA'ların çoğunun çok düşük düzeyde eksprese olduğu belirlenmiştir. En yüksek düzeyde ekspresyon düzeyi tespit edilen miRNA'ların, miR-71, miR-9, let-7, miR-1, miR-4989 ve miR-10 olduğu bildirilmiştir. Bu miRNA'ların, diğer *Taenia* türlerinde de yüksek düzeyde ekspresyon göstermesi, miRNA'ların parazitin gelişim, hayatta kalma veya konak-parazit etkileşiminde önemli rollerinin olabileceği hipotezini gündeme getirmiştir. miR-71'in in-vitro kültürlenmiş *E. multilocularis* metasestodlarında germinatif

hücrelerde ve germinal tabakanın diğer hücre tiplerinde eksprese edildiği belirlenmiştir. *E. multilocularis* miRNA'larının, metasestod gelişimi boyunca, ekspresyon analizleri ve tahmin edilen hedeflerinin in silico fonksiyonel analizleri ile birlikte, AE'nin tedavisi ve kontrolü için seçici terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür (128).

Orsten ve ark. (129), abdominal ultrasonografi incelemesi ile KE (12 aktif, 8 inaktif) tanısı konulmuş, 20 insan örneğinde, insan türevli miRNA'ların profilini belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla KE'li 20 bireyi çalışma grubu olarak 3 sağlıklı bireyi de kontrol grubu olarak araştırmaya dahil etmişlerdir. KE'li hastalardan ve sağlıklı kontrol bireylerinden aldıkları serum örneklerinde, miRNA ekspresyon profillerini, miScript miRNA HC PCR Array tekniği ile incelemişlerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, aktif KE teşhisi konulan hastalarda hsa-miR-4659a-5p, hsa-miR-4518, hsa-miR-3977, hsa-miR-4692, hsa-miR-181b-3p ve hsa-miR-4491 miRNA'larının, inaktif KE teşhisi konulan hastalarda ise hsa-miR-4687-5p miRNA'sının aşağı yönlü regüle olduğunu tespit etmişlerdir ($p < 0.05$). miRNA'ların, hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre etkileşimleri gibi patolojik süreçlerle ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (129).

Mahami-Oskouei ve ark. (130), KE teşhisi koyulmuş insanlarda, insan türevli miR-146a ve miR-155 miRNA'larının ekspresyon düzeylerini belirlemek için gerçekleştirdikleri bir çalışmada, KE ile enfekte 20 hastadan ve kontrol grubu olarak 20 sağlıklı bireyden plazma örnekleri almışlardır. Bu örneklerde, qRT-PCR analizleri ile miR-146a ve miR-155'in ekspresyon seviyelerini araştırmışlardır. Kontrol grubuna kıyasla KE'li tüm hastalarda miR-146a'nın ve miR-155'in ekspresyon seviyesinin arttığı tespit edilmiş, fakat miR-155'in

ekspresyon seviyesindeki artış ile ilgili çalışma ve kontrol grubu arasında bir korelasyon tespit edilememiştir. Plazmadaki miR-146a ve miR-155'in yukarı yönlü regülasyonunun KE için yeni bir biyobelirteç adayı olabileceği belirtilmiştir (130).

İnterjenik miRNA'ların transkripsiyonu, orijinal genlerin farklı hücre tiplerinde ve dokularda gelişim evrelerinde genişleyen hedeflere tercih edilmesine bağlı olup, parazitlerdeki ana biyofonksiyonel yollardan biridir. Bu gözlemler, miRNA'ların *Echinococcus* spp. ve KE'de önemli olduğunu ve bu nedenle teşhis veya tedavi hedefleri olarak kullanılabilirliğini düşündürmektedir (99). Farklı ara konaklarda (sığır ve koyun), haplotip farklılıklarının belirlenerek, farklı kist yapılarında (germinal membran ve/veya protoskoleks) miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar çok sınırlı sayıdadır. mir-71 Nemo-like kinase gen bölgesini hedef almakta olup, protoskoleks gelişimine dahil olmakta ve *Echinococcus* türlerinde konak makrofaj fonksiyonlarını düzenlemektedir (131; 123). Dolayısıyla mir-71'in protoskolekslerdeki ekspresyon seviyesinin belirlenmesi önemlidir. mir-7 ise ECANG7_04919, ECANG7_00818 ve ECANG7_03238 gen bölgelerini hedef almakta ve *Echinococcus* türlerinin gelişimsel morfogenezinde potansiyel bir rolünün olduğu bilinmektedir (113). Öte yandan mir-96, ECANG7_06901 gen bölgesini hedef almakta ve işlevi tam olarak bilinmemekte olup özellikle protoskoleks aşamasında yüksek bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu ifade edilmektedir (113).

Bu çalışmada, *E. granulosus*'un morfolojik değişiminde önemli rol oynadığı düşünülen parazit türevli egr-mir-7, egr-mir-71 ve egr-mir-96 miRNA profillerinin farklı ara konaklardaki (sığır ve koyun), farklı kist yapılarındaki (germinal

membran/protoskoleks) varlığı, ekspresyon düzeyleri ve haplotipler arasındaki ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Böylelikle;

1. *E. granulosus*'un sığır ve koyun izolatları içerisindeki genetik polimorfizminin PCR ve sekans analizleri ile belirlenerek türlerin tespit edilmesi,
2. Bu izolatlarda, parazit türevli egr-miR-7, egr-mir-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının gen ekspresyon düzeylerinin Real Time RT-qPCR analizleri ile belirlenmesi,
3. Bu izolatlardaki germinal membran ve/veya protoskolekslerdeki parazit türevli egr-miR-7, egr-mir-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının gen ekspresyon düzeylerinin Real Time RT-qPCR analizleri ile belirlenmesi,
4. miRNA'ların farklı kist yapılarındaki, farklı ara konaklardaki, farklı haplotiplerdeki profilleri ve ekspresyon düzeyleri ile bunların tür ve haplotiplerle ilişkisinin araştırılması, fertil ve steril kist oluşumunda miRNA'ların rolünün olup olmadığı hakkında bilgi sahibi olunması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Hidatik Kist Örneklerinin Toplanması

Çalışma materyalini oluşturan hidatik kist örnekleri, Elazığ ilindeki özel bir kesimhaneden Mart 2021 - Mart 2022 tarihleri arasında 41 sığır ve 41 koyun olmak üzere toplam 82 enfekte hayvandan toplandı. Bu amaçla kesimi takiben her bir hayvanın organları hidatik kist yönünden, inspeksiyon ve palpasyon yöntemiyle muayene edildi. Steril bir bistüri yardımıyla kistlere geniş bir alandan kesit yapılarak, kistler doku ve organlardan ayrıldı. Her bir kist ayrı ayrı plastik kaplara alındı ve soğuk zincir şartlarında muhafaza edilerek laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvarında steril 20 ml'lik şırınga ile kistlerden kist sıvısı aspire edilerek, steril 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Kist sıvıları 4000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Oluşan çökelti 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Kist sıvısı çökeltisi pastör pipeti yardımıyla lam üzerine alındı ve lamel kapatılıp protoskolekslerin varlığı ve fertilitésinin değerlendirilmesi açısından mikroskopik olarak incelendi.

Eş zamanlı olarak her bir hayvan için kist dokusundan pens yardımıyla germinal membran yapıları ayrıldı ve küçük bir parça alınarak 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Hem protoskoleks, hem de germinal membran örneklerini doku artıklarından arındırmak için, örnekler üzerine 1XPBS (phosphate-buffered saline) (pH=7.4) solüsyonundan 600 µl eklenip, kısa bir vorteks yapıldıktan sonra maksimum hızda (14.000 rpm'de) 1 dk süreyle santrifüj edildi ve sonrasında süpernatant atıldı. Bu işlem 4-5 kez daha tekrarlandı. Son yıkamanın ardından PBS

solüsyonu tamamen uzaklaştırıldıktan sonra eppendorf tüpler genomik DNA ve RNA izolasyonları için kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklandı.

4.2. Genomik DNA İzolasyonu

Laboratuvarda -80 °C’de muhafaza edilen materyaller pens yardımıyla alınıp temiz bir lam üzerine konulduktan sonra steril bir bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılarak 1,5 ml’lik eppendorf tüplere aktarıldı. Geri kalan kısım ise tekrar -80 °C’de saklandı. Genomik DNA izolasyonu ticari bir kit (Hibrigen, MG-GDNA-01-250 Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Eppendorf tüpler içerisindeki doku örneklerinin üzerine kit içeriğinde bulunan 500 µl solüsyon DHP tamponu eklendi ve vorteks yardımı ile homojen olana kadar karıştırıldı. Takiben, 20 µl Proteinase-K (Hibrigen, 20 mg/ml) ve 120 µl DA tamponu ilave edilip, vortekslendikten sonra 1 gece 65 °C’de inkübe edildi. Ertesi gün sıcak su banyosundan çıkarılarak kit protokolüne göre aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- Eppendorf tüplerdeki parazit materyali üzerine 120 µl DB tamponu ve 220 µl önceden soğutulmuş (%96-100) ethanol eklendi ve vorteks yapılarak karıştırıldı. Takiben karışımın tamamı, pipet yardımı ile 2 ml’lik toplama tüpü üzerindeki filtreli tüpe aktarıldı.
- 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpündeki sıvı atıldı.
- 500 µl DY tamponu filtreli tüpe eklendi ve 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra toplama tüpüne süzülen sıvı atıldı.
- Bir önceki adım tekrarlandı.
- Daha sonra toplama tüpü süzülen sıvı ile birlikte atıldı, filtreli tüp ise steril eppendorf tüp içine konularak membranın kuruması için 12.000

rpm’de 3 dakika santrifüj edildi ve eppendorf tüp, içinde biriken sıvı ile birlikte atıldı.

- Filtreli tüpler temiz 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alınıp üzerine önceden 60 °C’ye ısıtılmış 90 µl DE tamponu eklendi.
- Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- 12.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilip spin kolon atıldı.
- Eppendorf tüpün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA (gDNA) bulunmaktadır. Bu gDNA’lar kullanılmaya kadar -20 °C’de saklandı.

4.3. DNA Nanodrop Ölçümleri

Elde edilen genomik DNA’ların konsantrasyonu ve saflığı, Nanodrop cihazında 260/280 nm absorbans değerlerinde ölçümler yapılarak belirlendi. Bu ölçümlerde ölçümü yapılan DNA örneklerinin 260/280 oranının yaklaşık 1,8 ve konsantrasyonun ≥ 25 ng/µl olması beklenmektedir. Bu değerlere yakın olmayan DNA örneklerinde, gDNA izolasyonu tekrarlandı.

4.4. mt-CO1 Geninin PCR ile Çoğaltılması

Çalışmada Tablo 4’de gösterilen *E. granulosus* s.l. mt-CO1 hedef genini çoğaltan primerler kullanıldı (132).

Tablo 4. *E. granulosus* s.l. mt-CO1 gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primer dizisi.

Hedef Gen	Primer Adı	Primer Dizisi	Hedef PCR Ürünü (bp)
mt-CO1	Forward-CO1	5’-TGAATTTGCCACGTTTGAATGC-3’	875 bp
	Reverse-CO1	5’-GAACCTAACGACATAACATAATGA-3’	

Örneklerin kesin tür tayininin yapılabilmesi amacıyla *E. granulosus* s.l. mt-CO1 gen bölgesine spesifik primerler, ticari Taq DNA Polymerase (Thermo – EP0401) ve dNTP mix (Thermo – R0241) kullanılarak PCR analizleri gerçekleştirildi. Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PCR karışımı için ticari kit protokolü takip edilerek Tablo 5'de belirtilen miktarlarda mastermiks karışımı hazırlandı.

Tablo 5. *E. granulosus* s.l. mt-CO1 gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PCR mastermiksi.

Solüsyon Adı	Konsantrasyonu	Miktarı
PCR Taq buffer	10X	5 µl
dNTP Mix	0.2 mM (her bir deoksitükleotidden)	5 µl
Forward Primer	20 pmol	2 µl
Reverse Primer	20 pmol	2 µl
MgCl ₂	25 mM	2 µl
Template DNA	≥25ng/µl	4 µl
Taq DNA Polymerase	5 U/µL	0.25 µl
Nuclease Free Water	-	29.75 µl
Toplam Hacim		50 µl

Pozitif kontrol olarak çalışma öncesi sekans analizi yaptırılmış ve pozitifliği doğrulanmış *E. granulosus* s.l. örneği, negatif kontrol olarak DNase/RNase içermeyen su kullanıldı.

Hazırlanan mastermiks karışımlarını içeren tüpler, PCR analizleri için thermal cycler cihazına konuldu. PCR cihazında uygulanan thermal cycler döngüsü Tablo 6'da gösterildiği şekilde uygulandı.

Tablo 6. *E. granulosus* s.l. mt-CO1 geninin PCR analizinde kullanılan thermal cycler döngüsü.

PCR Aşaması	Sıcaklık	Süre	Tekrar
Ön denatürasyon	94 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	
Annealing (Bağlanma)	52 °C	45 saniye	30
Extension (Uzama)	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	10 dakika	1

4.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Dizilenmesi

PCR cihazından alınan ürünler %1.4'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu. Jel hazırlandıktan sonra, 10 µl PCR ürünü, 6 µl yükleme solüsyonu (1/6 oranında sulandırılmış, Dna Gel Loading Dye 6X; Thermo Scientific, R0611) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Bandların moleküler ağırlığını belirlemek için 100 bp'lik marker (100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, SM0623) kullanıldı. Elektroforez işlemi, 1XTAE tampon solüsyonu (Tris-asetat-EDTA) kullanılarak jel tankında 100 volt akımda 40 dakika süreyle gerçekleştirildi ve daha sonra tanktan çıkarılan jel, UV transilluminatörde bandların varlığı yönünden incelendi. Hidatik kist izolatları için spesifik primerler ile band veren tüm mt-CO1 PCR ürünleri ticari bir firmaya (BM Labosis, Ankara, Türkiye) gönderilerek tek yönlü DNA dizi analizi yaptırıldı.

4.6. mt-CO1 Geninin Dizi Analizi, Alignment ve Filogenetik Analiz

DNA dizilerinin görüntülenmesi için FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle Washington, ABD) (<http://www.geospiza.com>) kullanıldı. Sekans uçları, "BLAST" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) araması kullanılarak daha önceden yayınlanan sekanslar ile karşılaştırılarak kırıldı. Kırılan sekanslar daha sonra

MEGA X programına yüklendi (133). Hizalama, NCBI PubMed'de yayınlanmış *E. granulosus* s.s. için (NC_044548, MN787534, KX020400, MG808349 ve MZ714555) ve *E. canadensis* için (MH301007, KX510134, KX010868, AB777925, MK321260 ve MN340039) referans sekanslar kullanılarak uygulandı. NCBI PubMed'de yayınlanan *E. ortleppi* (KX010903), *E. equinus* (AF346403), *E. multilocularis* (AB777920) ve *Taenia saginata* (AB107246) sekansları dış gruplar olarak kullanıldı. MEGA X programında Maximum Likelihood methodu ile en uygun filogenetik ağaç modeli belirlendi ve bootstrap testi (1000 tekrar) ile ağaç oluşturuldu (133).

4.7. Haplotip Analizi

E. granulosus s.s. dizileri DnaSP 6'ya yüklendi (134). Popülasyon çeşitliliği endeksleri (haplotip sayıları (h), haplotip çeşitliliği (Hd), nükleotid çeşitliliği (π), tarafsızlık endeksleri Tajima'nın D (135) ve Fu's istatistikleri (136), Fu ve Li'nin D ve F testleri (137), DnaSP 6 kullanılarak hesaplandı (134). DnaSP 6, kullanıcının bir sonraki analiz için ek bilgi eklemesine izin veren NEXUS gibi bir dizi çıktı formatı oluşturmak için kullanıldı. Haplotip ağı PopART-1.7 yazılımı aracılığıyla minimum aralık ağacında görünen tüm kenarları içeren MSN (Minimum Spanning Networks) yöntemi kullanılarak oluşturuldu (138) (<http://popart.otago.ac.nz>).

4.8. Total RNA İzolasyonu

Germinal membran ve protoskolekslerdeki miRNA profllerinin araştırılabilmesi için trizol ile RNA ekstraksiyon yöntemi uygulandı. İzole edilen total RNA örnekleri Nanodrop ölçümlerine tabi tutuldu, yüksek kalite ve kantitede RNA elde edildiği görüldü. Trizol (Hibrizol-MG-TRZ-01-100-Hibrigen)

kullanılarak yapılan total RNA izolasyonu işlemi aşağıda belirtilen şekilde uygulandı.

- Her 1 ml trizol için 50-100 mg olacak şekilde germinal membran/protoskoleks örnekleri ekstraksiyon işlemine başlamadan önce bistüri yardımıyla parçalandı.
- Örnekler 1,5 ml lik vida kapaklı eppendorf tüplere aktarıldı.
- Her tüp içerisine 3 mm çapında cam boncuk ve 1 ml trizol solüsyonu eklendikten sonra homojenizatörde 5 dakika homojenizasyon yapıldı.
- Nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışması için homojenize edilmiş numuneler 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Tüp içerisine 1 ml trizol reaktifi için 0,2 ml kloroform ilave edildi.
- Tüpler yüksek devirde vortekslendi.
- Tüpler soğutmalı santrifüjde 12.000 g'de, 4°C'de 15 dakika süre ile santrifüj işlemine tabi tutuldu.
- Santrifüj aşamasından sonra, tüp içerisindeki karışımın üç faza ayrıldığı görüldü. En üstte bulunan renksiz ve sıvı faz RNA içermektedir. En üstteki RNA içeren şeffaf ve sıvı faz temiz bir tüpe aktarıldı.
- Tüp üzerine 0,5 ml izopropanol (her 1 ml trizol reaktifi için) ilave edildi.
- Örnekler oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Tüpler soğutmalı santrifüjde 12.000 g'de, 4°C'de, 10 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutuldu.
- Tüpün üst kısmında bulunan süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü.
- Tüp üzerine 1 ml %75'lik etanol eklendi.

- RNA'nın ethanol içerisinde yıkanması için parmak hareketleri ile hafifçe vurularak karışması sağlandı.
- Tüpler soğutmalı santrifüjde 7.500 g'de, 4°C'de, 5 dakika süre ile santrifüj işlemine tabi tutuldu.
- Tüpte bulunan %75'lik ethanol dikkatli bir şekilde döküldü.
- Ethanol ile yıkama işlemi tekrarlandı. Toplam iki kez ethanol ile yıkama işlemi yapıldı.
- Soğutmalı santrifüjde RNA'nın çöktürülmesi için, tüpler 4°C'de 7.500 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Tüpte bulunan %75'lik ethanol dikkatli bir şekilde döküldü.
- Tüpün dip kısmına çöktürülmüş olan RNA peleti, kabin içerisinde tüplerin kapakları açık bırakılarak kurutuldu.
- Kurutulan tüpler içerisinde bulunan RNA peleti üzerine 50 µl RNase içermeyen su eklenerek pelet çözündürüldü.
- RNA peletinin tam olarak çözünmesi için tüpler, 70°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletildi.
- Tüpler kısa süreli düşük devirde vortekslendikten sonra RNA örnekleri, analizler yapılincaya kadar -80°C'de muhafaza edildi (139).

4.9. RNA Nanodrop Ölçümleri

Elde edilen RNA'ların kalite ve kantitesi, Nanodrop cihazında 260/280 nm absorbans değerlerinde ölçümler yapılarak belirlendi. Bu ölçümlerde ölçümü yapılan total RNA örneklerinin 260/280 değerinin yaklaşık 2 olması beklenmektedir. Total RNA örneklerinin nanodrop ölçümlerinde, 260/280 değeri

2'ye yaklaşık olmayan ve konsantrasyonları ≥ 50 ng/ μ l şartlarını sağlamayan örneklerde total RNA izolasyonları tekrarlandı.

4.10. Total RNA Konsantrasyonlarının RT-qPCR Analizleri İçin Standardizasyonu

Nanodrop cihazında kalite ve kantite ölçümleri yapılan ve konsantrasyonları 50 ng/ μ l olarak ayarlanan Total RNA örnekleri RT reaksiyonunda kullanıldı (92).

4.11. Reverse Transcription Stem Loop Primerler

miRNA'ların RT reaksiyonu sırasında hedef genin uzatılarak komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi işlemi için stem loop primer tekniği kullanıldı (140). miRNA'lar ile ilgili bir database olan <http://www.mirbase.org> adresinden araştırılması hedeflenen miRNA'lar ile ilgili sekanslar araştırıldı, her bir miRNA için, sadece bir miRNA'ya spesifik stem loop primerler dizayn edildi. Stem loop primer dizaynında, stem loop yapısındaki hedef miRNA'yı RT aşamasında uzatacak kısım sabit olarak kalırken, stem loop yapının uç kısmındaki son 8 nükleotid hedef miRNA'lara spesifik olacak şekilde dizayn edildi. Hedef miRNA sekansının son 8 nükleotidinin komplementeri stem loop yapısının son 8 nükleotidine spesifik olacak şekilde sentezlendi. Bu sayede araştırılması hedeflenen miRNA genleri, Reverse Transcription aşamasında spesifik olarak RT stem loop primerlerine bağlanarak, aynı zamanda uzatılarak cDNA'ya her bir miRNA için spesifik olarak dönüştürüldü. Referans (house keeping) internal kontrol olan U6 geni için RT primeri kullanıldı. Ekspresyon düzeyleri araştırılan miRNA genlerine ait RT stem loop primer ve U6 referans genine ait RT primer ve hedef miRNA sekansları Tablo 7' de gösterilmiş olup, stem loop primer dizilerindeki hedef

miRNA'lara spesifik olan son 8 nükleotid ve hedef miRNA skanslarındaki son 8 nükleotid kalın ve altı çizili olarak belirtilmiştir.

Tablo 7. RT aşamasında kullanılan RT primer, RT stem loop primer ve miRNA sekansları.

Hedef Gen	RT ve RT Stem Loop Primer Dizileri	Hedef miRNA Sekansı
U6 (House Keeping)	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAB-3'	Referans Gen
egr-miR-7	5'GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGG AAGAAGACCGAAGAATGTGCGTCTCGCC TTCTTTCACAACATA-3'	TGGAAGACTGGTGATATGTTGT
egr-miR-71	5'GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGG AAGAAGACCGAAGAATGTGCGTCTCGCC TTCTTCTCTCACTA-3'	TGAAAGACGATGGTAGTGAGA
egr-miR-96	5'GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGG AAGAAGACCGAAGAATGTGCGTCTCGCC TTCTTTCGACAATTC-3'	ATTGGCACTTTTGAATTGTC

4.12. Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR) Mastermiks ve Termal Döngü

RT reaksiyonu, her bir numune için 250 ng total RNA olacak şekilde, ticari TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo-Catalog: 4366596) kullanılarak mastermiks karışımları her örnek, her miRNA ve referans U6 geni için ayrı ayrı tüplerde toplam hacim 15 µl olacak şekilde kit protokolü uygulanarak hazırlandı. Hedef miRNA'lar ve referans internal kontrol gen için hazırlanan örnek mastermiks karışımı Tablo 8'de belirtilmiştir.

Tablo 8. Hedef miRNA ve internal kontrol geni için RT-qPCR mastermiksi.

Solüsyon Adı	Konsantrasyonu	Miktarı (Her bir örnek ve gen için)
dNTPs	100 mM	0.15 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	50 U/µl	1 µl
Reverse Transcription Buffer	10X	1.50 µl
RNase Inhibitor	20 U/µl	0.19 µl
Nuclease Free Water	-	4.16 µl
Hedef Gen Primer	5 pmol	3 µl
Örnek RNA	50 ng/µl	5 µl
Toplam Hacim		15 µl

Her bir örnek, bir referans gen ve 3 miRNA olmak üzere 4 hedef gen için 4 ayrı tüpte Reverse Transcription qPCR analizlerine tabi tutuldu. Toplam 92 örnek için (82 germinal membran ve 10 protoskoleks) 368 tüpte RT-qPCR analizi gerçekleştirildi. Mastermiks karışımları buz üzerinde hazırlandıktan sonra bekletilmeden thermal cycler cihazına aktarıldı. RT-qPCR analizleri için termal döngü Tablo 9’da belirtildiği şekilde uygulandı.

Tablo 9. RT-qPCR Thermal Cycler Döngüsü.

PCR Aşaması	Sıcaklık	Süre
Reverse transcription	16 °C	30 dakika
	42 °C	30 dakika
Stop reaction	85 °C	5 dakika
Hold	4 °C	∞

4.13. miRNA Profili ve Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Hedef miRNA’ların profili ve ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için miRNA database olan <http://www.mirbase.org> adresinden egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA’larının, dünya gen bankası <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> adresinden de U6 referans house keeping internal kontrol geninin

sekansları çıkartıldı. Çıkartılan sekanslara göre Real Time PCR reaksiyonunda kullanılacak olan forward primerler belirlendi. Aynı zamanda egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'ları için tasarlanan stem loop yapısına tam uygun şekilde oturacak, universal reverse primer sekansları da belirlendi. Real Time PCR için kullanılan primer sekansları Tablo 10' da gösterildi.

Tablo 10. Real Time PCR primer sekansları.

Hedef Gen	Forward Primer	Reverse/Universal Reverse Primer
U6 (House Keeping)	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT
egr-miR-7	TGGAAGACTGGTGATATGTTGT	
egr-miR-71	TGAAAGACGATGGTAGTGAGA	CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT
egr-miR-96	ATTGGCACTTTTGAATTGTC	

miRNA profili ve ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için her hedef miRNA ve referans gen için ayrı ayrı olmak üzere her bir örnek için toplam dört ayrı gende ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Real Time PCR reaksiyonları her örnek ve her gen bölgesi için üç tekrarlı olacak şekilde çalışıldı.

4.14. Real Time PCR

Real Time PCR reaksiyonu, her gen için ayrı ayrı tüplerde spesifik forward ve reverse primerler ile ticari bir Sybr-Green kiti (A.B.T.TM 2X qPCR SYBR-Green Mastermiks Cat: Q03-02-05) kullanılarak gerçekleştirildi. Real Time PCR analizlerinde optimal annealing ısısı hedef genlerin tamamı ve referans house keeping geni olan U6 için 60°C olarak belirlendi. Real Time PCR testinin optimizasyonları ve melting curve analizleri ile doğrulaması yapıldıktan sonra test aşamasına geçildi.

Her örnek ve her gen bölgesi için ayrı ayrı tüplerde karışımlar hazırlandı. Hedef miRNA'lar ve referans internal kontrol gen için hazırlanan örnek mastermiks karışımı Tablo 11'de gösterildi.

Tablo 11. Hedef miRNA ve internal kontrol geni için Real Time PCR mastermiksi.

Solüsyon Adı	Konsantrasyonu	Miktarı (Her bir örnek ve gen için)
qPCR SYBRGreen Mastermiks	2X	10 µl
ROX Dye	50X	0.4 µl
Hedef Gen Forward Primer	10 µM	1 µl
Hedef Gen Reverse Primer	10 µM	1 µl
Örnek (cDNA)	-	1.2 µl
Nuclease Free Water	-	6.4 µl
Toplam Hacim		20 µl

Mastermiks karışımları her örnek ve hedef dört gen için ayrı ayrı tüplerde üç tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışımlar Real Time PCR cihazına ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için konuldu. Real Time PCR cihazında Tablo 12'de belirtilen termal sıcaklık döngü ve süreleri uygulandı.

Tablo 12. Real Time PCR termal döngü ve melting curve koşulları.

PCR Aşaması	Sıcaklık	Süre	Tekrar
İlk Denatürasyon	95 °C	5 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	40
Annealing (Okuma)	60 °C	30 saniye	
Melting Curve	65 – 95 °C	2-5 saniye/step	1

Yapılan tüm Real Time PCR reaksiyonları melting curve analizleriyle birlikte çalışıldı. Melting curve analizi sonrasında erime eğrilerinde problem olan örneklerin Real Time PCR analizleri tekrarlandı. Yine Real Time PCR analizleri gerçekleştirildikten sonra melting curve eğrileri ile birlikte her gen için üç tekrarlı

cycle threshold (Ct) değerleri de incelendi. Her gen için ayrı ayrı olmak üzere üç tekrarlı Ct değerleri karşılaştırıldı. Ct değerinin değerlendirilmesi ve testin geçerli olması için, üç tekrardan en az ikisinde, Ct değerleri arasındaki farkın ≤ 0.5 olması şartı arandı. Ct değerleri arasındaki farkın 0.5 değerinden büyük olduğu görülen örneklerde Real Time PCR analizleri tekrarlandı. Dolayısıyla Real Time PCR analizlerinde hem melting curve analizleriyle, hem de Ct değerinin analizleriyle iki aşamalı bir kontrol sistemi uygulandı.

4.15. İstatistiksel Analiz

miRNA profillerinin nispi ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı. Protoskoleks, germinal membran, haplotip farklılıkları, doku ve organ farklılıkları arasındaki miRNA düzeylerinin kıyaslanması Mann-Whitney U non-parametrik test kullanılarak değerlendirildi (141).

5. BULGULAR

Bu çalışma süresince 41'i koyun, 41'i sığır olmak üzere toplamda 82 hidatik kist örneği toplandı. Her örnek için fertilité muayenesi gerçekleştirildi. Koyun orjinli hidatik kist örneklerinden 10 örnek fertil olarak tespit edildi ve fertil olan 10 hidatik kist örneğinden protoskoleks örnekleri de alındı. Hidatik kist ile enfekte sığır akciğeri ve karaciğeri Şekil 1'de, fertil bir kistten elde edilen protoskoleksin mikroskopik görüntüsü ise Şekil 2'de gösterildi. Hidatik kist izolatlarının organ lokasyonları, alınan örnek çeşidi ve fertilité durumu Tablo 13'deki gibidir.



Şekil 1. Mezbaneden toplanan hidatik kistli organların görünümü.

A: Akciğer, B: Karaciğer



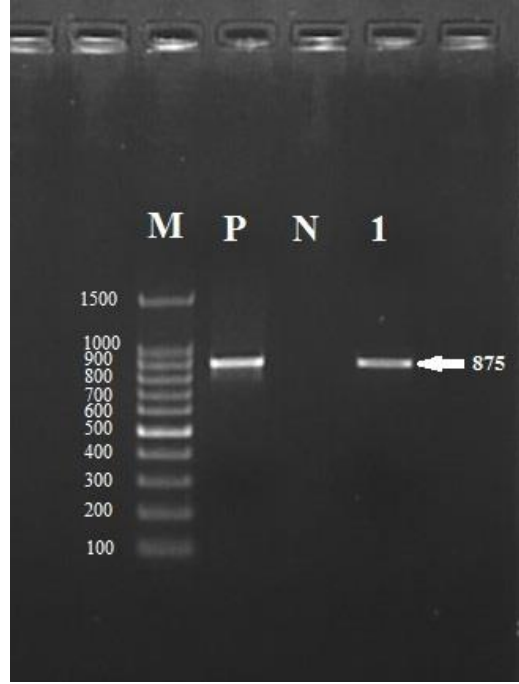
Şekil 2. Koyun karaciğer hidatik kistinden elde edilen protoskolekslerin mikroskopik görüntüsü (X40).

Tablo 13. Hidatik kist izolatlarının organ yerleşimleri.

Hayvan Türü	Organ	Örnek Türü	Fertil / Steril	Adet	Toplam
Sığır	Akciğer	Germinal membran	Steril	36	41
	Karaciğer		Steril	5	
Koyun	Akciğer	Germinal membran	Steril	18	41
	Akciğer		Fertil	6	
	Karaciğer	Steril	12	10	
	Karaciğer	Fertil	4		
	Dalak	Steril	1	10	
	Akciğer	Protoskoleks	Fertil		6
	Karaciğer		Fertil		4

5.1. mt-CO1 PCR Bulguları

82 hidatik kist örneğinin mt-CO1 gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı ve bütün örneklerde 875 bp büyüklüğünde band elde edildi (Şekil 3).



Şekil 3. Sığır ve koyun izolatlarının mt-CO1 gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü. M: DNA marker (100 bp), P: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol, 1: Örnek izolat.

5.2. mt-CO1 Geninin Sekans Analiz Bulguları

Bütün PCR ürünlerinin tek yönlü DNA dizi analizleri yaptırıldı. FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle Washington, ABD) (<http://www.geospiza.com>)’de sekanslar incelendi ve hatalı okumalar dendogramlar doğrultusunda düzeltildi. Sekans uçları, "BLAST" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) araması kullanılarak yayınlanan sekanslar ile karşılaştırılarak kırıldı ve 792 bp’lik diziler elde edildi. BLAST analizi sonucu 41 koyun ve 40 sığır izolatına ait sekansların (ELZC01-ELZC40, ELZS01-ELZS41) *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) bir sığır sekansının (ELZC41) ise *E. canadensis* (G6/7) olduğu belirlendi. Bütün sekanslar GenBank’ta kayıt altına alındı ve accession (kabul) numaraları kaydedildi (Tablo 14).

Tablo 14. GenBank'ta kayıt altına alınan sekanslara ait accession numaraları.

İzolat sayısı (Adet)	İzolat adı	Sekans boyutu	Accession numarası
40	ELZC01-ELZC40		OP411032-OP411071
1	ELZC41	792 bp	OP412301
41	ELZS01-ELZS41		OP412304-OP412344

5.2.1. Alignment Analiz Bulguları

BLAST analizi sonucunda en fazla sekans ile %100 benzer olan ve erişim numarası "NC_044548" nolu referans sekans hizalama işleminde kullanıldı. Kırpma sonucu hatalı okumalar elimine edildiğinde güvenli aralık olarak belirlenen 792 bp büyüklüğündeki mt-CO1 gen bölgesine ait sekans örneklerinin MEGA X programı (133) ile hizalama işlemleri gerçekleştirildi. Hizalama işlemi sonucunda nokta mutasyonları belirlendi ve referans dizi baz alınarak mutasyona uğramış nükleotid pozisyonları Tablo 15'de gösterildi.

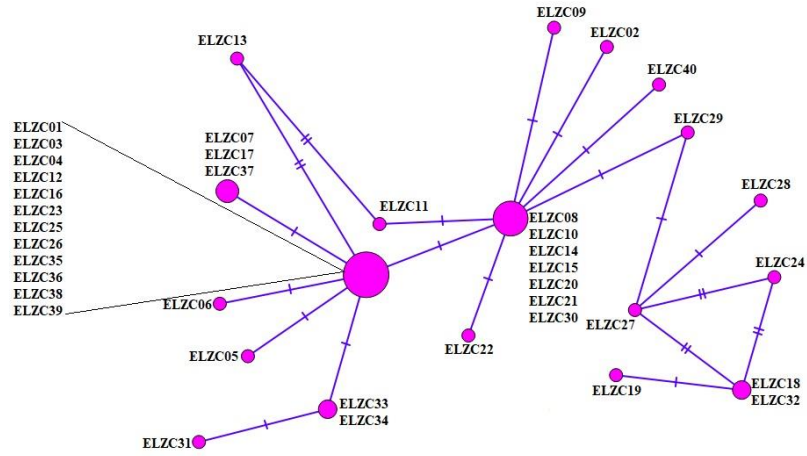
Tablo 15. mt-CO1 geninin (792 bp) analiz edilen 29 haplotip arasında nükleotid varyasyon pozisyonları.

Nükleotid pozisyonu	47	55	78	150	278	362	429	433	445	455	489	500	617	627	638	646	690	701	713	735	742	744	749	752	759	763	
NC_044548 (Referans sekans)	C	A	G	C	C	C	A	C	C	C	T	C	A	T	T	T	T	G	T	T	A	A	G	T	T	T	
Hap01																											
Hap02		G							T																		
Hap03																				C							
Hap04																							T				
Hap05												G															
Hap06										T																	
Hap07								T	T																		
Hap08					T				T																		
Hap09					T																			T			
Hap10							G			T						C											
Hap11							G			T						C						T					
Hap12									T			T															
Hap13	T									T						C											
Hap14									T	T						C											
Hap15									T	T					C	C											
Hap16									T	T																	
Hap17				T																					C		
Hap18				T																							
Hap19						T			T																		
Hap20									T	T											A						
Hap21												T															
Hap22																					A						
Hap23																									C	G	
Hap24																				A	A	C					
Hap25					T											C											
Hap26			C				G			T						C											
Hap27									T										A								
Hap28														A			C			C							
Hap29											G																

5.2.2. Filogenetik Analiz Bulguları

E. granulosus s.s. ve *E. canadensis*'e yönelik mt-CO1 gen bölgesinin filogenetik analizleri için BLAST analizi sonucunda benzerlik oranı yüksek yayınlanmış referans sekanslar kullanıldı. *E. granulosus* s.s. için (NC_044548, MN787534, KX020400, MG808349 ve MZ714555) ve *E. canadensis* için (MH301007, KX510134, KX010868, AB777925, MK321260 ve MN340039) belirlenen referans sekans dizileri alındı. Dış grup sekans olarak *E. ortleppi* (KX010903), *E. equinus* (AF346403), *E. multilocularis* (AB777920) ve *Taenia saginata* (AB107246) kullanıldı. "FASTA" formatında indirilen tüm sekanslar çalışma içi sekanslar ile hizalama yapılarak uygun boyutlarda kırpıldı ve MEGA X programına yüklendi (133). Sekanslara en uygun filogenetik ağaç modeli Hasegawa-Kishino-Yano model, Has Invariant Sites (HKY+I) olarak belirlendi ve Maximum Likelihood istatistiksel metodu uygulanarak bootstrap testi (1000 tekrar) ile filogenetik ağaç oluşturuldu. mt-CO1 geninin 792 bp uzunluğundaki bir fragmanına dayanan *E. canadensis* (G6/7) örneğinin (n = 1) ve *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) örneklerinin kendi arasında belirlenen haplotip gruplarının (Hap_01-29) filogenetik ağacı Şekil 4'de gösterildiği gibidir.

analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen haplotip ağı sonucunda, bir ana haplotip ile konfigürasyon içinde düzenlenmiş, 1-17 mutasyon adımıyla diğer haplotiplerden ayrılmış ve toplam izolatların %30'unu (12/40) kapsayan 19 haplotip tespit edildi (Şekil 5). mt-CO1 sekansları için %47.05 (8/17)'i parsimony informative olan 17 polimorfik alan tespit edildi ve gen bölgesi için yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği gözlemlendi (Tablo 16). Tajima's D, popülasyon genişlemesini ve/veya seçimi saflaştırmayı ifade eden değer negatifti. Gözlemlenen önemli ölçüde negatif Fu's Fs değerleri, yakın zamandaki bir popülasyon genişlemesi beklenen nadir haplotiplerin varlığını gösterdi. Dolayısıyla bu haplotip gruplarının %73.68 (14/19)'sinin tekli haplotip olması sonuçları destekledi.



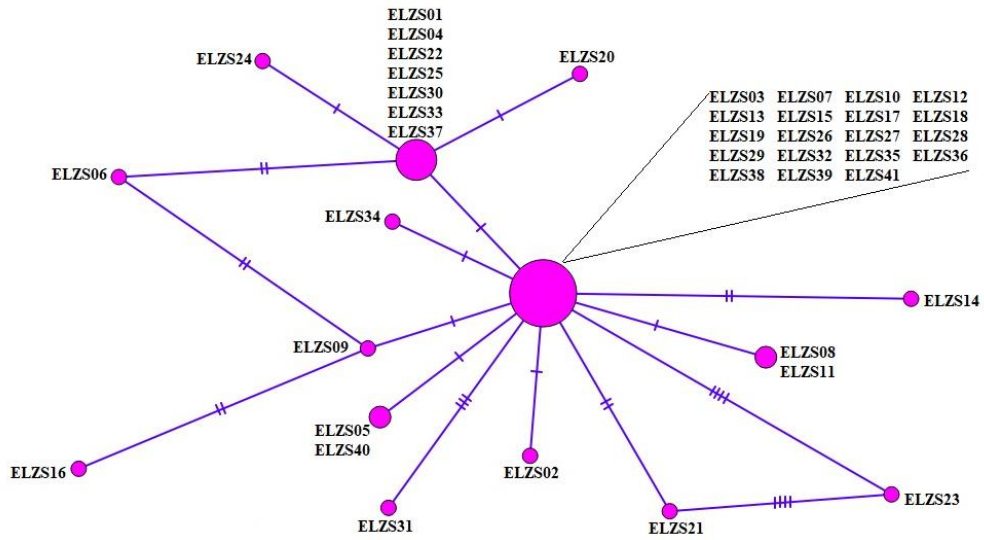
Şekil 5. *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) sığır izolatlarının (792 bp) mt-CO1 geni için haplotip ağı. Dairelerin boyutu, her haplotipin frekansı ile orantılıdır. Haplotipleri ayıran mutasyonların sayısı çizgi işaretleri ile gösterilmiştir.

Tablo 16. *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) sığır izolatlarının mt-CO1 geninin (792 bp) nükleotid verileri kullanılarak elde edilen çeşitlilik ve nötrlük indeksleri.

n	Hn	hd ± SD	π d ± SD	Tajima's D	p değeri	Fu's Fs	p değeri	FLD	FLF
40	19	0.882±0.039	0.00266±0.00034	-1.53037	P> 0.10	-14.406	0.000	-1.92013	-2.11462

n: İzolat sayısı, Hn: haplotip sayısı; hd: haplotip çeşitliliği; π d: nükleotid çeşitliliği; SD: standard sapma; FLD: Fu and Li's D istatistik testi; FLF: Fu and Li's F istatistik testi. FLD, FLF'nin p değeri: P > 0.05; p değeri: istatistiksel olarak önemsiz (P > 0.10).

Yine bu çalışmada elde edilen 41 koyun izolatının içerisinde mt-CO1 gen sekansı sonucu *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olarak belirlenen sekansların haplotip analizi gerçekleştirildi. Elde edilen haplotip ağı sonucunda, bir ana haplotip ile konfigürasyon içinde düzenlenmiş, 1-19 mutasyon adımıyla diğer haplotiplerden ayrılmış ve toplam izolatların %47.05'ini (15/41) kapsayan 15 haplotip tespit edildi (Şekil 6). mt-CO1 sekansları için %36.8 (7/19)'i parsimony informative olan 19 polimorfik alan tespit edildi ve gen bölgesi için yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği gözlemlendi (Tablo 17). Tajima's D, popülasyon genişlemesini ve/veya seçimi saflaştırmayı ifade eden değer negatifti. Gözlemlenen önemli ölçüde negatif Fu's Fs değerleri, yakın zamandaki bir popülasyon genişlemesi beklenen nadir haplotiplerin varlığını gösterdi. Dolayısıyla bu haplotip gruplarının %73.33 (11/15)'sinin tekli haplotip olması sonuçları destekledi.



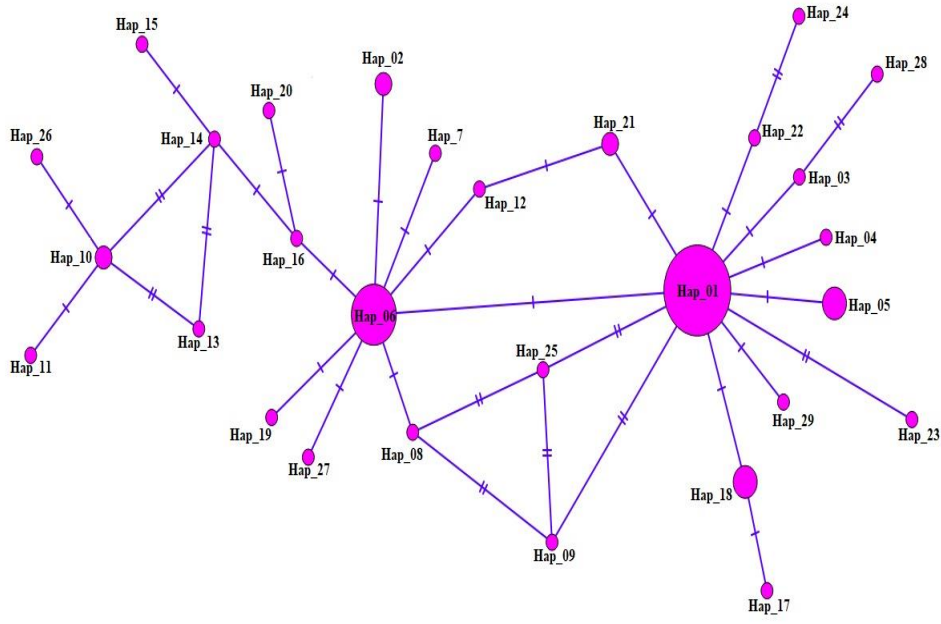
Şekil 6. *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) koyun izolatlarının (792 bp) mt-CO1 geni için haplotip ağı. Dairelerin boyutu, her haplotipin frekansı ile orantılıdır. Haplotipleri ayıran mutasyonların sayısı çizgi işaretleri ile gösterilmiştir.

Tablo 17. *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) koyun izolatlarının mt-CO1 geninin (792 bp) nükleotid verileri kullanılarak elde edilen çeşitlilik ve nötrlük indeksleri.

n	Hn	hd ± SD	π d ± SD	Tajima's D	p değeri	Fu's Fs	p değeri	FLD	FLF
41	15	0.763±0.063	0.00199±0.00036	-2.11039	P < 0.05	-10.262	0.000	-2.69589	-2.95530

n: İzolat sayısı, Hn: haplotip sayısı; hd: haplotip çeşitliliği; π d: nükleotid çeşitliliği; SD: standard sapma; FLD: Fu and Li's D istatistik testi; FLF: Fu and Li's F istatistik testi. FLD, FLF'nin p değeri: P < 0.05; p değeri: istatistiksel olarak önemsiz (P > 0.10).

E. granulosus s.s. (G1 ve G3) hem sığır (n=40) hem koyun (n=41) izolatlarının (toplam 81) mt-CO1 gen bölgesi için haplotip analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen haplotip ağı sonucunda, bir ana haplotip ile konfigürasyon içinde düzenlenmiş, 1-26 mutasyon adımıyla diğer haplotiplerden ayrılmış ve toplam izolatların %38.27'sini (31/81) kapsayan 29 haplotip tespit edildi (Şekil 7). mt-CO1 sekansları için %50 (13/26)'si parsimony informative olan 26 polimorfik alan tespit edildi ve gen bölgesi için yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği gözlemlendi (Tablo 18). Tajima's D, popülasyon genişlemesini ve / veya seçimi saflaştırmayı ifade eden değer negatifti. Gözlemlenen önemli ölçüde negatif Fu's Fs değerleri, yakın zamandaki bir popülasyon genişlemesi beklenen nadir haplotiplerin varlığını gösterdi. Dolayısıyla bu haplotip gruplarının %75.86 (22/29)'sinin tekli haplotip olması sonuçları destekledi. Koyun ve sığır orjinli toplam 81 örneğin haplotip grupları, örnek numaraları ile ilgili detaylar Tablo 19'da gösterilmiştir.



Şekil 7. *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) koyun ve sığır izolatlarının (792 bp) mt-CO1 geni için haplotip ağı. Dairelerin boyutu, her haplotipin frekansı ile orantılıdır. Haplotipleri ayıran mutasyonların sayısı çizgi işaretleri ile gösterilmiştir.

Tablo 18. *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) koyun ve sığır izolatlarının mt-CO1 geninin (792 bp) nükleotid verileri kullanılarak elde edilen çeşitlilik ve nörlük indeksleri.

n	Hn	hd ± SD	π d ± SD	Tajima's D	p değeri	Fu's Fs	p değeri	FLD	FLF
81	29	0.824±0.037	0.00234±0.00026	-1.98571	P < 0.05	-29.098	0.000	-2.68636	-2.89477

n: İzolat sayısı, Hn: haplotip sayısı; hd: haplotip çeşitliliği; π d: nükleotid çeşitliliği; SD: standard sapma; FLD: Fu and Li's D istatistik testi; FLF: Fu and Li's F istatistik testi. FLD, FLF'nin p değeri: P < 0.05; p değeri: istatistiksel olarak önemsiz (P > 0.10).

Tablo 19. Koyun orjinli 41 ve sığır orjinli 40 hidatik kist örneğinde belirlenen haplotip grupları ve gruplardaki örnek sayıları.

Sıra No	Haplotip Grubu	Sığır ve/veya Koyun Haplotip Grubu	Gruptaki Örnek Sayısı	Örnek Numaraları	Genbank Erişim numarası
1	Hap_01	Sığır Hap_01 Koyun Hap_03	31	ELZC01	OP411032
				ELZC03	OP411034
				ELZC04	OP411035
				ELZC12	OP411043
				ELZC16	OP411047
				ELZC23	OP411054
				ELZC25	OP411056
				ELZC26	OP411057
				ELZC35	OP411066
				ELZC36	OP411067
				ELZC38	OP411069
				ELZC39	OP411070
				ELZS03	OP412306
				ELZS07	OP412310
				ELZS10	OP412313
				ELZS12	OP412315
				ELZS13	OP412316
				ELZS15	OP412318
				ELZS17	OP412320
				ELZS18	OP412321
				ELZS19	OP412322
				ELZS26	OP412329
				ELZS27	OP412330
				ELZS28	OP412331
				ELZS29	OP412332
				ELZS32	OP412335
				ELZS35	OP412338
				ELZS36	OP412339
				ELZS38	OP412341
				ELZS39	OP412342
				ELZS41	OP412344
2	Hap_02	Sığır Hap_02 Koyun Hap_10	2	ELZC02	OP411033
3	Hap_03	Sığır Hap_03	1	ELZC05	OP411036
4	Hap_04	Sığır Hap_04	1	ELZC06	OP411037
5	Hap_05	Sığır Hap_05 Koyun Hap_02	4	ELZC07	OP411038
				ELZC17	OP411048
				ELZC37	OP411068
				ELZS02	OP412305

Sıra No	Haplotip Grubu	Sığır ve/veya Koyun Haplotip Grubu	Gruptaki Örnek Sayısı	Örnek Numaraları	Genbank Erişim numarası
				ELZC08	OP411039
				ELZC10	OP411041
				ELZC14	OP411045
				ELZC15	OP411046
				ELZC20	OP411051
				ELZC21	OP411052
6	Hap_06	Sığır Hap_06 Koyun Hap_01	14	ELZC30	OP411061
				ELZS01	OP412304
				ELZS04	OP412307
				ELZS22	OP412325
				ELZS25	OP412328
				ELZS30	OP412333
				ELZS33	OP412336
				ELZS37	OP412340
7	Hap_07	Sığır Hap_07	1	ELZC09	OP411040
8	Hap_08	Sığır Hap_08	1	ELZC11	OP411042
9	Hap_09	Sığır Hap_09	1	ELZC13	OP411044
10	Hap_10	Sığır Hap_10	2	ELZC18	OP411049
				ELZC32	OP411063
11	Hap_11	Sığır Hap_11	1	ELZC19	OP411050
12	Hap_12	Sığır Hap_12	1	ELZC22	OP411053
13	Hap_13	Sığır Hap_13	1	ELZC24	OP411055
14	Hap_14	Sığır Hap_14	1	ELZC27	OP411058
15	Hap_15	Sığır Hap_15	1	ELZC28	OP411059
16	Hap_16	Sığır Hap_16	1	ELZC29	OP411060
17	Hap_17	Sığır Hap_17	1	ELZC31	OP411062
				ELZC33	OP411064
18	Hap_18	Sığır Hap_18 Koyun Hap_04	4	ELZC34	OP411065
				ELZS05	OP412308
				ELZS40	OP412343
19	Hap_19	Sığır Hap_19	1	ELZC40	OP411071
20	Hap_20	Koyun Hap_05	1	ELZS06	OP412309
21	Hap_21	Koyun Hap_06	2	ELZS08	OP412311
				ELZS11	OP412314
22	Hap_22	Koyun Hap_07	1	ELZS09	OP412312
23	Hap_23	Koyun Hap_08	1	ELZS14	OP412317
24	Hap_24	Koyun Hap_09	1	ELZS16	OP412319
25	Hap_25	Koyun Hap_11	1	ELZS21	OP412324
26	Hap_26	Koyun Hap_12	1	ELZS23	OP412326
27	Hap_27	Koyun Hap_13	1	ELZS24	OP412327
28	Hap_28	Koyun Hap_14	1	ELZS31	OP412334
29	Hap_29	Koyun Hap_15	1	ELZS34	OP412337

5.3. Total RNA Nanodrop Ölçümleri

Elde edilen total RNA örneklerinin kalite ve kantitesi, Nanodrop cihazında 260/280 nm absorbans değerlerinde ölçümler yapılarak belirlendi. Total RNA örneklerinin 260/280 nm absorbans değerlerinin yaklaşık 2 ($\pm 0,1$) olduğu belirlendi. Tüm total RNA örneklerinin konsantrasyonu, nanodrop cihazında ölçülerek kaydedildi.

Total RNA izolatlarında, *E. granulosus* etkenlerinin ara konak formu olan hidatik kist yapılarında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larında ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların belirlenmesi hedeflendiğinden total RNA izolatlarının kantiteleri, literatürde belirtildiği gibi tüm örneklerin dilüsyonları 50 ng/ μ l olacak şekilde, DNase ve RNase içermeyen su kullanılarak ayarlandı. Total RNA örneklerinin Nanodrop cihazında ölçülen kantite değerleri Tablo 20 ve 21'de verilmiştir.

Tablo 20. Sığır orjinli hidatik kist örneklerinde total RNA izolatlarının nanodrop ölçüm sonuçları.

Sıra No	Örnek No	Kist Lokalizasyonu	Fertil/Steril	Örnek Türü	RNA Kantite (ng/µl)
1	ELZC01	Akciğer	Steril	Germinal membran	135
2	ELZC02	Karaciğer	Steril	Germinal membran	135
3	ELZC03	Akciğer	Steril	Germinal membran	775
4	ELZC04	Akciğer	Steril	Germinal membran	620
5	ELZC05	Akciğer	Steril	Germinal membran	85
6	ELZC06	Akciğer	Steril	Germinal membran	219
7	ELZC07	Akciğer	Steril	Germinal membran	100
8	ELZC08	Akciğer	Steril	Germinal membran	370
9	ELZC09	Akciğer	Steril	Germinal membran	293
10	ELZC10	Akciğer	Steril	Germinal membran	783
11	ELZC11	Akciğer	Steril	Germinal membran	329
12	ELZC12	Akciğer	Steril	Germinal membran	517
13	ELZC13	Akciğer	Steril	Germinal membran	1189
14	ELZC14	Akciğer	Steril	Germinal membran	634
15	ELZC15	Akciğer	Steril	Germinal membran	644
16	ELZC16	Akciğer	Steril	Germinal membran	114
17	ELZC17	Akciğer	Steril	Germinal membran	534
18	ELZC18	Akciğer	Steril	Germinal membran	616
19	ELZC19	Akciğer	Steril	Germinal membran	734
20	ELZC20	Akciğer	Steril	Germinal membran	428
21	ELZC21	Akciğer	Steril	Germinal membran	450
22	ELZC22	Akciğer	Steril	Germinal membran	362
23	ELZC23	Akciğer	Steril	Germinal membran	128
24	ELZC24	Akciğer	Steril	Germinal membran	203
25	ELZC25	Akciğer	Steril	Germinal membran	238
26	ELZC26	Akciğer	Steril	Germinal membran	425
27	ELZC27	Akciğer	Steril	Germinal membran	544
28	ELZC28	Karaciğer	Steril	Germinal membran	785
29	ELZC29	Akciğer	Steril	Germinal membran	258
30	ELZC30	Akciğer	Steril	Germinal membran	316
31	ELZC31	Akciğer	Steril	Germinal membran	635
32	ELZC32	Akciğer	Steril	Germinal membran	540
33	ELZC33	Akciğer	Steril	Germinal membran	80
34	ELZC34	Akciğer	Steril	Germinal membran	822
35	ELZC35	Akciğer	Steril	Germinal membran	474
36	ELZC36	Akciğer	Steril	Germinal membran	435
37	ELZC37	Karaciğer	Steril	Germinal membran	300
38	ELZC38	Karaciğer	Steril	Germinal membran	147
39	ELZC39	Akciğer	Steril	Germinal membran	461
40	ELZC40	Karaciğer	Steril	Germinal membran	511
41	ELZC41	Akciğer	Steril	Germinal membran	568

Tablo 21. Koyun orjinli hidatik kist örneklerinde total RNA izolatlarının nanodrop ölçüm sonuçları.

Sıra No	Örnek No	Kist Lokalizasyonu	Fertil/Steril	Örnek Türü	RNA Kantite (ng/ul)
1	ELZS01	Akciğer	Steril	Germinal membran	250
2	ELZS02	Akciğer	Steril	Germinal membran	120
3	ELZS03	Akciğer	Steril	Germinal membran	125
4	ELZS04	Akciğer	Steril	Germinal membran	110
5	ELZS05	Karaciğer	Steril	Germinal membran	110
6	ELZS06	Akciğer	Steril	Germinal membran	282
7	ELZS07	Karaciğer	Steril	Germinal membran	140
8	ELZS08	Akciğer	Fertil	Germinal membran	68
9	ELZS09	Akciğer	Fertil	Germinal membran	174
10	ELZS10	Karaciğer	Fertil	Germinal membran	107
11	ELZS11	Akciğer	Fertil	Germinal membran	245
12	ELZS12	Karaciğer	Steril	Germinal membran	257
13	ELZS13	Akciğer	Steril	Germinal membran	165
14	ELZS14	Akciğer	Fertil	Germinal membran	182
15	ELZS15	Akciğer	Fertil	Germinal membran	235
16	ELZS16	Karaciğer	Fertil	Germinal membran	461
17	ELZS17	Akciğer	Steril	Germinal membran	206
18	ELZS18	Akciğer	Steril	Germinal membran	254
19	ELZS19	Karaciğer	Steril	Germinal membran	182
20	ELZS20	Karaciğer	Steril	Germinal membran	410
21	ELZS21	Karaciğer	Steril	Germinal membran	109
22	ELZS22	Akciğer	Steril	Germinal membran	156
23	ELZS23	Karaciğer	Fertil	Germinal membran	427
24	ELZS24	Karaciğer	Steril	Germinal membran	89
25	ELZS25	Akciğer	Steril	Germinal membran	438
26	ELZS26	Karaciğer	Steril	Germinal membran	311
27	ELZS27	Akciğer	Fertil	Germinal membran	612
28	ELZS28	Karaciğer	Fertil	Germinal membran	277
29	ELZS29	Karaciğer	Steril	Germinal membran	670
30	ELZS30	Akciğer	Steril	Germinal membran	423
31	ELZS31	Akciğer	Steril	Germinal membran	280
32	ELZS32	Karaciğer	Steril	Germinal membran	418
33	ELZS33	Akciğer	Steril	Germinal membran	338
34	ELZS34	Karaciğer	Steril	Germinal membran	200
35	ELZS35	Akciğer	Steril	Germinal membran	420
36	ELZS36	Dalak	Steril	Germinal membran	1336
37	ELZS37	Akciğer	Steril	Germinal membran	260
38	ELZS38	Akciğer	Steril	Germinal membran	270
39	ELZS39	Akciğer	Steril	Germinal membran	421
40	ELZS40	Karaciğer	Steril	Germinal membran	745
41	ELZS41	Akciğer	Steril	Germinal membran	314
42	ELZS08	Akciğer	Fertil	Protoskoleks	235
43	ELZS09	Akciğer	Fertil	Protoskoleks	340
44	ELZS10	Karaciğer	Fertil	Protoskoleks	213
45	ELZS11	Akciğer	Fertil	Protoskoleks	155
46	ELZS14	Akciğer	Fertil	Protoskoleks	122
47	ELZS15	Akciğer	Fertil	Protoskoleks	60
48	ELZS16	Karaciğer	Fertil	Protoskoleks	180
49	ELZS23	Karaciğer	Fertil	Protoskoleks	60
50	ELZS27	Akciğer	Fertil	Protoskoleks	160
51	ELZS28	Karaciğer	Fertil	Protoskoleks	140

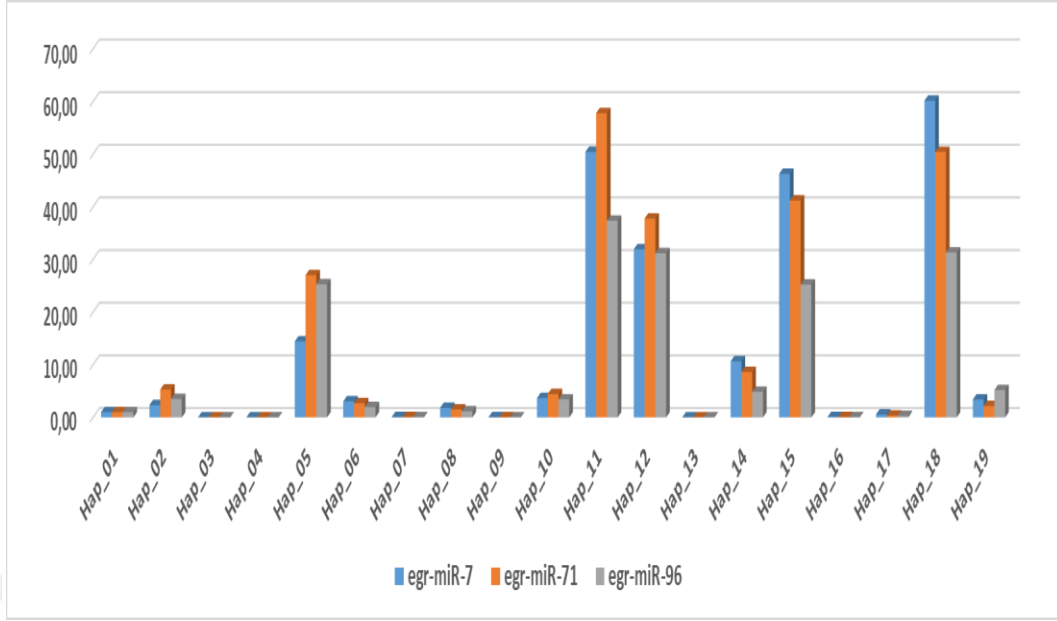
5.4. Hidatik Kist Örneklerinde miRNA Ekspresyonu

Örneklerin sığır/koyun orjinli olması, fertil/steril olma durumu, genotip ve haplotip grubu, kist yapısı (germinal membran/protoskoleks) gibi durumlar göz önüne alınarak farklı parametrelerde karşılaştırmalar yapılmıştır.

5.4.1. Sığır Orjinli Hidatik Kist Örneklerinde miRNA Ekspresyonu

Sığır kökenli *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenen 40 hidatik kist örneğinin kendi içerisinde ayrıldığı 19 haplotip grubu arasında hedef miRNA genlerinin germinal membran yapısındaki ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı.

Sığır orjinli hidatik kistlerin, birbirleri içerisindeki farklı haplotip gruplarında hedef miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki farklılıklarının değerlendirilebilmesi için en fazla örnek sayısı bulunan Hap_01 grubu kontrol grubu olarak belirlendi ve diğer sığır haplotip gruplarının miRNA gen ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldı. Karşılaştırılan haplotip grupları arasında egr-miR-7, egr-miR71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılıklar olduğu belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. Sığır orjinli hidatik kistlerde haplotip gruplarına göre miRNA ekspresyon düzeyleri (Hap_01 kontrol grubu).

Kontrol grubu olarak belirlenen Hap_01 grubu ile diğer haplotip grupları arasında yapılan karşılaştırmada, kontrol grubuna kıyasla Hap_06 grubunda egr-miR-96, Hap_08 grubunda egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96, Hap_17 grubunda egr-miR-7'nin ekspresyon düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. İstatistiki olarak önemsiz ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %11.11 (2/18), egr-miR-71 için %5.55 (1/18) ve egr-miR-96 için %11.11 (2/18) olarak belirlendi.

Kontrol grubuna kıyasla Hap_03, Hap_04, Hap_07, Hap_09, Hap_13 ve Hap_16 gruplarında; egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamında, Hap_17 grubunda egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larında istatistiki olarak anlamlı bulunan aşağı yönlü ekspresyon belirlenmiştir. İstatistiki olarak önemli bulunan düşük miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %33.33 (6/18), egr-miR-71 için %38.89 (7/18) ve egr-miR-96 için %38.89 (7/18) olarak belirlendi.

Kontrol grubuna kıyasla Hap_02, Hap_05, Hap_10, Hap_11, Hap_12, Hap_14, Hap_15, Hap_18 ve Hap_19 gruplarında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamının, Hap_06 grubunda egr-miR-7 ve egr-miR-71'in 2.16 kattan 60.19 kata kadar değişen oranlarda yukarı yönlü eksprese edildiği belirlendi. Haplotip gruplarındaki miRNA ekspresyon kat değişimi oranları istatistiki olarak anlamlı bulundu. İstatistiki olarak önemli bulunan yüksek miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %55.56 (10/18), egr-miR-71 için %55.56 (10/18) ve egr-miR-96 için %50 (9/18) olarak belirlendi.

E. granulosus s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenen sığır orjinli 40 örneğin bulunduğu 19 haplotip grubu arasındaki egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeylerindeki karşılaştırmalara ilişkin kat değişimi (Fold Change) değerleri ve istatistiki veriler Tablo 22'de gösterilmiştir.

Tablo 22. Sığır orjinli hidatik kistlerde, haplotip grupları arasında miRNA'ların ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.

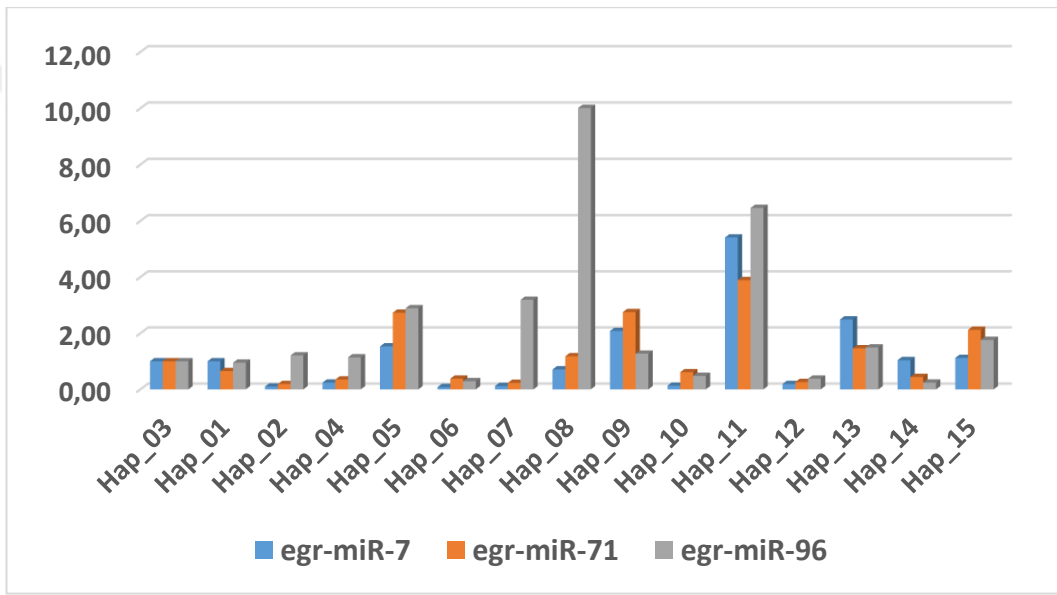
Haplotip Grubu	Örnek Sayısı	Grup	Hedef miRNA	Fold Change (Kat Değişimi)	P Değeri	İstatistiki Fark
Hap_01	12	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	
			egr-miR-71	1	Kontrol	Kontrol
			egr-miR-96	1	Kontrol	
Hap_02	1	Çalışma	egr-miR-7	2.360	0.0085	Anlamlı
			egr-miR-71	5.310	0.0013	Anlamlı
			egr-miR-96	3.520	0.0026	Anlamlı
Hap_03	1	Çalışma	egr-miR-7	0.020	0.0035	Anlamlı
			egr-miR-71	0.020	0.0034	Anlamlı
			egr-miR-96	0.010	0.0034	Anlamlı
Hap_04	1	Çalışma	egr-miR-7	0.010	0.0033	Anlamlı
			egr-miR-71	0.010	0.0034	Anlamlı
			egr-miR-96	0.010	0.0033	Anlamlı
Hap_05	3	Çalışma	egr-miR-7	14.450	0.0042	Anlamlı
			egr-miR-71	27.030	0.0037	Anlamlı
			egr-miR-96	25.320	0.0038	Anlamlı
Hap_06	7	Çalışma	egr-miR-7	3.050	0.0157	Anlamlı
			egr-miR-71	2.710	0.0203	Anlamlı
			egr-miR-96	1.970	0.0504	Anlamsız

Haplotip Grubu	Örnek Sayısı	Grup	Hedef miRNA	Fold Change (Kat Değişimi)	P Değeri	İstatistiksel Fark
Hap_07	1	Çalışma	egr-miR-7	0.070	0.0042	Anlamlı
			egr-miR-71	0.060	0.0041	Anlamlı
			egr-miR-96	0.040	0.0038	Anlamlı
Hap_08	1	Çalışma	egr-miR-7	1.820	0.0676	Anlamsız
			egr-miR-71	1.530	0.1400	Anlamsız
			egr-miR-96	1.170	0.5308	Anlamsız
Hap_09	1	Çalışma	egr-miR-7	0.040	0.0038	Anlamlı
			egr-miR-71	0.030	0.0037	Anlamlı
			egr-miR-96	0.020	0.0035	Anlamlı
Hap_10	2	Çalışma	egr-miR-7	3.680	0.0114	Anlamlı
			egr-miR-71	4.460	0.0088	Anlamlı
			egr-miR-96	3.430	0.0128	Anlamlı
Hap_11	1	Çalışma	egr-miR-7	50.460	0.0035	Anlamlı
			egr-miR-71	57.820	0.0034	Anlamlı
			egr-miR-96	37.370	0.0036	Anlamlı
Hap_12	1	Çalışma	egr-miR-7	31.940	0.0036	Anlamlı
			egr-miR-71	37.790	0.0036	Anlamlı
			egr-miR-96	31.210	0.0037	Anlamlı
Hap_13	1	Çalışma	egr-miR-7	0.01	0.0033	Anlamlı
			egr-miR-71	0.01	0.0033	Anlamlı
			egr-miR-96	0.01	0.0033	Anlamlı
Hap_14	1	Çalışma	egr-miR-7	10.670	0.0047	Anlamlı
			egr-miR-71	8.630	0.0052	Anlamlı
			egr-miR-96	4.860	0.0080	Anlamlı
Hap_15	1	Çalışma	egr-miR-7	46.280	0.0057	Anlamlı
			egr-miR-71	41.230	0.0058	Anlamlı
			egr-miR-96	25.240	0.0061	Anlamlı
Hap_16	1	Çalışma	egr-miR-7	0.080	0.0044	Anlamlı
			egr-miR-71	0.060	0.0040	Anlamlı
			egr-miR-96	0.040	0.0037	Anlamlı
Hap_17	1	Çalışma	egr-miR-7	0.570	0.0770	Anlamsız
			egr-miR-71	0.360	0.0186	Anlamlı
			egr-miR-96	0.290	0.0126	Anlamlı
Hap_18	2	Çalışma	egr-miR-7	60.190	0.0034	Anlamlı
			egr-miR-71	50.450	0.0035	Anlamlı
			egr-miR-96	31.340	0.0036	Anlamlı
Hap_19	1	Çalışma	egr-miR-7	3.410	0.0129	Anlamlı
			egr-miR-71	2.160	0.0371	Anlamlı
			egr-miR-96	5.210	0.0075	Anlamlı

5.4.2. Koyun Orjinli Hidatik Kist Örneklerinde miRNA Ekspresyonu

Koyun orjinli *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenen 41 hidatik kist örneğinin bulunduğu 15 haplotip grubu arasında, germinal membran yapısındaki hedef miRNA genlerinin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Koyun

orjinli hidatik kistlerin, farklı haplotip gruplarında miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında en fazla örnek sayısı bulunan Hap_03 grubu kontrol grubu olarak belirlendi. Diğer haplotip gruplarındaki miRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslanarak karşılaştırmalar yapıldı. Koyun orjinli kistlerin yer aldığı 15 haplotip grubu arasındaki miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalarına ait grafik Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9. Koyun orjinli hidatik kistlerde haplotip gruplarına göre miRNA ekspresyon düzeyleri (Hap_03 kontrol grubu).

Haplotip grupları arasında yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki egr-miR-7, egr-miR71 ve egr-miR-96 miRNA’larının ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirlendi. Kontrol grubu olan Hap_03 grubuna kıyasla, Hap_01 grubunda egr-miR-7, egr-miR71 ve egr-miR-96 miRNA’ların tamamında, Hap_05, Hap_08, Hap_14 ve Hap_15 gruplarında egr-miR-7’de, Hap_08, Hap_10 ve Hap_13 haplotip gruplarında egr-miR-71’de, Hap_02, Hap_04, Hap_09,

Hap_13 ve Hap_15 haplotip gruplarında egr-miR-96'da miRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. İstatistiksel olarak miRNA ekspresyon düzeylerinde fark tespit edilmeme oranı genel olarak egr-miR-7 için %35.71 (5/14), egr-miR-71 için %28.57 (4/14) ve egr-miR-96 için %42.86 (6/14) olarak belirlendi.

Kontrol grubu olarak belirlenen Hap_03 grubuna kıyasla, Hap_06 ve Hap_12 gruplarında egr-miR-7, egr-miR71 ve egr-miR-96 miRNA'ların tamamında, Hap_02, Hap_04, Hap_07 ve Hap_10 haplotip gruplarında egr-miR-7'de, Hap_02, Hap_04 ve Hap_07 haplotip gruplarında egr-miR-71'de, Hap_10 haplotip grubunda egr-miR-96 miRNA'larında aşağı yönlü ekspresyon olduğu belirlendi. Haplotip gruplarındaki aşağı yönlü miRNA ekspresyon oranları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İstatistiksel olarak önemli bulunan düşük miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %42.86 (6/14), egr-miR-71 için %42.86 (6/14) ve egr-miR-96 için %35.71 (5/14) olarak belirlendi.

Kontrol grubu olan Hap_03 grubuna kıyasla, Hap_11 grubunda egr-miR-7, egr-miR71 ve egr-miR-96 miRNA'ların tamamında, Hap_09 ve Hap_13 grubunda egr-miR-7'de, Hap_05, Hap_09 ve Hap_14 gruplarında egr-miR-71'de, Hap_07, Hap_08 ve Hap_14 gruplarında egr-miR-96'da miRNA ekspresyonunun, 2.08 kattan 10 kata kadar değişen oranlarda yukarı yönlü eksprese edildiği belirlendi. Haplotip gruplarındaki miRNA ekspresyon düzeylerindeki kat değişimi oranları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İstatistiksel olarak önemli bulunan yüksek miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %21.43 (3/14), egr-miR-71 için %28.57 (4/14) ve egr-miR-96 için %21.43 (3/14) olarak belirlendi.

Koyun orjinli 41 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenen

örneklerin bulunduğu 15 haplotip grubu arasındaki egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeylerindeki karşılaştırmalara ilişkin kat değişimi (Fold Change) değerleri ve istatistiki veriler Tablo 23'de gösterilmiştir.

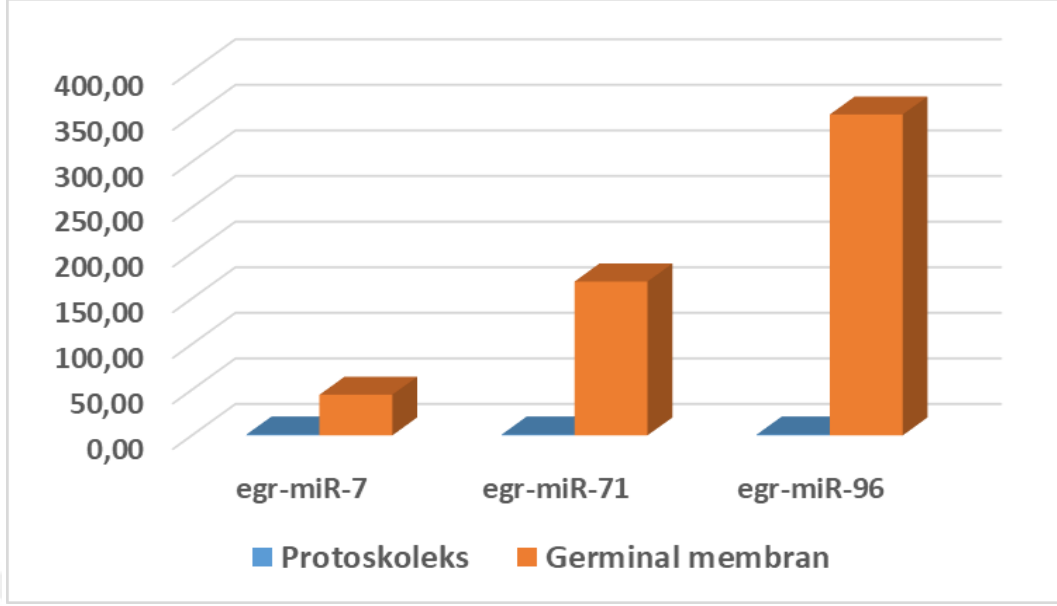
Tablo 23. Koyun orjinli hidatik kistlerde, haplotip grupları arasında miRNA'ların ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.

Haplotip Grubu	Örnek Sayısı	Grup	Hedef miRNA	Fold Change (Kat Değişimi)	P Değeri	İstatistiki Fark
Hap_03	19	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	
			egr-miR-71	1	Kontrol	Kontrol
			egr-miR-96	1	Kontrol	
Hap_01	7	Çalışma	egr-miR-7	1.000	0.995	Anlamsız
			egr-miR-71	0.650	0.134	Anlamsız
			egr-miR-96	0.950	0.826	Anlamsız
Hap_02	1	Çalışma	egr-miR-7	0.100	0.005	Anlamlı
			egr-miR-71	0.190	0.008	Anlamlı
			egr-miR-96	1.210	0.438	Anlamsız
Hap_04	2	Çalışma	egr-miR-7	0.240	0.010	Anlamlı
			egr-miR-71	0.350	0.018	Anlamlı
			egr-miR-96	1.140	0.580	Anlamsız
Hap_05	1	Çalışma	egr-miR-7	1.530	0.142	Anlamsız
			egr-miR-71	2.730	0.020	Anlamlı
			egr-miR-96	2.890	0.018	Anlamlı
Hap_06	2	Çalışma	egr-miR-7	0.080	0.004	Anlamlı
			egr-miR-71	0.380	0.022	Anlamlı
			egr-miR-96	0.290	0.012	Anlamlı
Hap_07	1	Çalışma	egr-miR-7	0.120	0.005	Anlamlı
			egr-miR-71	0.230	0.009	Anlamlı
			egr-miR-96	3.190	0.014	Anlamlı
Hap_08	1	Çalışma	egr-miR-7	0.710	0.205	Anlamsız
			egr-miR-71	1.180	0.505	Anlamsız
			egr-miR-96	10.010	0.005	Anlamlı
Hap_09	1	Çalışma	egr-miR-7	2.080	0.042	Anlamlı
			egr-miR-71	2.750	0.020	Anlamlı
			egr-miR-96	1.270	0.349	Anlamsız
Hap_10	1	Çalışma	egr-miR-7	0.130	0.006	Anlamlı
			egr-miR-71	0.610	0.106	Anlamsız
			egr-miR-96	0.480	0.042	Anlamlı
Hap_11	1	Çalışma	egr-miR-7	5.410	0.007	Anlamlı
			egr-miR-71	3.890	0.011	Anlamlı
			egr-miR-96	6.460	0.006	Anlamlı
Hap_12	1	Çalışma	egr-miR-7	0.190	0.007	Anlamlı
			egr-miR-71	0.260	0.011	Anlamlı
			egr-miR-96	0.380	0.022	Anlamlı
Hap_13	1	Çalışma	egr-miR-7	2.490	0.025	Anlamlı
			egr-miR-71	1.460	0.177	Anlamsız
			egr-miR-96	1.490	0.162	Anlamsız
Hap_14	1	Çalışma	egr-miR-7	1.040	0.879	Anlamsız
			egr-miR-71	0.440	0.032	Anlamlı
			egr-miR-96	0.240	0.010	Anlamlı
Hap_15	1	Çalışma	egr-miR-7	1.120	0.653	Anlamsız
			egr-miR-71	2.120	0.040	Anlamlı
			egr-miR-96	1.760	0.077	Anlamsız

5.4.3. Protoskoleks ve Germinal Membranlardaki miRNA Ekspresyonu

E. granulosus s.s. (G1 ve G3) genotipi olduğu belirlenen koyun orjinli fertil 10 hidatik kist örneğinde germinal membran ve protoskoleks yapılarındaki egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmalarda protoskolekslerdeki ekspresyon düzeyleri kontrol grubu olarak seçilerek değerlendirilmeler yapıldı. Örneklerin tamamında protoskoleks yapısına kıyasla germinal membran yapısında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının yüksek düzeylerde eksprese olduğu belirlendi.

Fertil olan 10 koyun orjinli örneğin ekspresyon değerlerinin ortalaması alınarak da germinal membran ve protoskoleks yapılarındaki miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Yine bu değerlendirmede de protoskoleks yapısındaki miRNA ekspresyon düzeyi kontrol grubu olarak belirlendi. Protoskoleks yapısına kıyasla germinal membran yapısında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının sırasıyla yaklaşık 44, 168 ve 351 kat yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği belirlendi (Şekil 10). Bu artışlar istatistiki açıdan anlamlı olarak değerlendirildi.



Şekil 10. Koyun orjinli fertil 10 hidatik kist örneğinde, germinal membran ve protoskolekslerdeki ortalama miRNA ekspresyon düzeyleri (protoskoleks kontrol grubu).

Fertil olduğu tespit edilen koyun orjinli 10 hidatik kist örneğinde protoskoleks yapısına kıyasla germinal membran yapısında istatistiki olarak önemli bulunan yüksek miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %100 (10/10), egr-miR-71 için %100 (10/10) ve egr-miR-96 için %100 (10/10) olarak belirlendi.

Koyun orjinli, *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenen 10 fertil örneğin germinal membran ve protoskoleks yapılarındaki egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeylerindeki karşılaştırmalara ilişkin kat değişimi (Fold Change) değerleri ve istatistiki veriler Tablo 24'de gösterilmiştir.

Tablo 24. Koyun orjinli fertil hidatik kistlerde, germinal membran ve protoskoleks yapılarında miRNA'ların ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.

Örnek Numarası	Örnek Sayısı	Kist Yapısı	Grup	Hedef miRNA	Fold Change (Kat Değişimi)	P Değeri	İstatistiki Fark
ELZS08	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	17.81	0.004019	Anlamlı
				egr-miR-71	33.53	0.003619	Anlamlı
				egr-miR-96	1034.56	0.003243	Anlamlı
ELZS09	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	13.3	0.004350	Anlamlı
				egr-miR-71	55.96	0.003456	Anlamlı
				egr-miR-96	779.78	0.003247	Anlamlı
ELZS10	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	5.40	0.007	Anlamlı
				egr-miR-71	187.44	0.003	Anlamlı
				egr-miR-96	360.56	0.003	Anlamlı
ELZS11	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	26.38	0.0037	Anlamlı
				egr-miR-71	921.30	0.0032	Anlamlı
				egr-miR-96	25.28	0.0038	Anlamlı
ELZS14	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	64.08	0.0034	Anlamlı
				egr-miR-71	203.77	0.0033	Anlamlı
				egr-miR-96	1987.18	0.0032	Anlamlı
ELZS15	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	123.61	0.00333	Anlamlı
				egr-miR-71	243.72	0.00328	Anlamlı
				egr-miR-96	2698.41	0.00324	Anlamlı
ELZS16	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	46.15	0.0035	Anlamlı
				egr-miR-71	112.42	0.0033	Anlamlı
				egr-miR-96	54.72	0.0035	Anlamlı
ELZS23	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	15.17	0.0042	Anlamlı
				egr-miR-71	43.89	0.0035	Anlamlı
				egr-miR-96	91.17	0.0034	Anlamlı
ELZS27	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	750.55	0.0032	Anlamlı
				egr-miR-71	853.16	0.0032	Anlamlı
				egr-miR-96	646.71	0.0033	Anlamlı
ELZS28	1	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	
				egr-miR-96	1	Kontrol	
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	222.09	0.0033	Anlamlı
				egr-miR-71	277.82	0.0033	Anlamlı
				egr-miR-96	229.29	0.0033	Anlamlı
ELZS08-11 ELZS14-16 ELZS23 ELZS27 ELZS28	10	Protoskoleks	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-71	1	Kontrol	Kontrol
				egr-miR-96	1	Kontrol	Kontrol
		Germinal membran	Çalışma	egr-miR-7	44.61	0.0035	Anlamlı
				egr-miR-71	168.83	0.0033	Anlamlı
				egr-miR-96	351.97	0.0032	Anlamlı

5.4.4. Sığır ve Koyun Orjinli Hidatik Kist Örneklerinde Haplotip Grupları Arasında miRNA Ekspresyonu

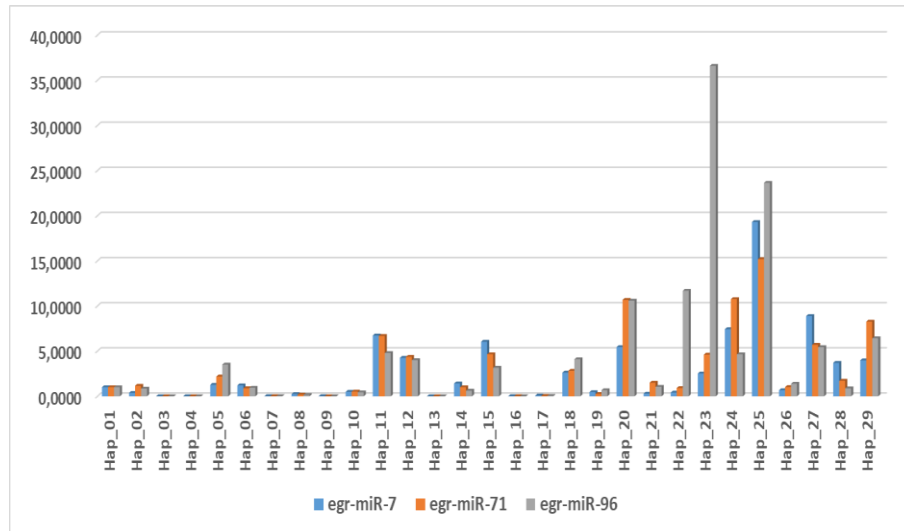
E. granulosus s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenen sığır kökenli 40 ve koyun kökenli 41 olmak üzere toplam 81 hidatik kist örneğinin germinal membran dokusundaki miRNA ekspresyon düzeyleri haplotip gruplarına göre karşılaştırıldı. *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi olduğu belirlenen 81 hidatik kist örneğin dahil olduğu 29 haplotip grubu içerisinde, 31 örneğin yer aldığı Hap_01 haplotip grubu en yüksek sayıda örneği içerdiğinden, miRNA ekspresyon düzeylerinin kıyaslanmasında kontrol grubu olarak belirlendi. Haplotip grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı.

Kontrol grubu olarak belirlenen Hap_01 grubuna kıyasla, Hap_06, Hap_14 ve Hap_26 gruplarında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamında, Hap_05 grubunda egr-miR-7'de, Hap_02, Hap_10, Hap_21, Hap_22 ve Hap_28 gruplarında egr-mir-71'de, Hap_02, Hap_19, Hap_21 ve Hap_28 gruplarında egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. İstatistiki olarak fark tespit edilmeyen miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %14.29 (4/28), egr-miR-71 için %28.57 (8/28) ve egr-miR-96 için %25 (7/28) olarak belirlendi.

Karşılaştırmada kontrol grubu olarak belirlenen Hap_01 grubuna kıyasla, Hap_03, Hap_04, Hap_07, Hap_08, Hap_09, Hap_13, Hap_16 ve Hap_17 haplotip gruplarında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamında, Hap_02, Hap_10, Hap_19 ve Hap_22 haplotip gruplarında egr-miR-7'de, Hap_19 grubunda egr-mir-71'de, Hap_10 grubunda egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeylerinde aşağı yönlü ekspresyon tespit edildi. Kontrol grubuna göre aşağı yönlü

tespit edilen miRNA ekspresyon düzeyi farklılığı istatistiki olarak anlamlı bulundu. Aşağı yönlü tespit edilen miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %46.43 (13/28), egr-miR-71 için %32.14 (9/28) ve egr-miR-96 için %32.14 (9/28) olarak belirlendi.

Kontrol grubu olarak belirlenen Hap_01 grubuna kıyasla, Hap_11, Hap_12, Hap_15, Hap_18, Hap_20, Hap_23, Hap_24, Hap_25, Hap_27 ve Hap_29 haplotip gruplarında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamında, Hap_21 ve Hap_28 haplotip gruplarında egr-miR-7'de, Hap_05 grubunda egr-miR-71'de, Hap_22 grubunda egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeylerinde 2.19 kattan 36.61 kata kadar değişen oranlarda yukarı yönlü ekspresyon tespit edildi. Kontrol grubuna göre yukarı yönlü tespit edilen miRNA ekspresyon düzeyi farklılığı istatistiki olarak anlamlı bulundu. Yukarı yönlü tespit edilen miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %39.28 (11/28), egr-miR-71 için %39.29 (11/28) ve egr-miR-96 için %42.86 (12/28) olarak belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Sığır ve koyun orjinli hidatik kist örneklerinde haplotip grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri (Hap_01 kontrol grubu).

E. granulosus s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenen, sığır orjinli 40 ve koyun orjinli 41 olmak üzere toplam 81 örneğin bulunduğu 29 haplotip grubu arasındaki *egr-miR-7*, *egr-miR-71* ve *egr-miR-96* miRNA'larının ekspresyon düzeylerindeki karşılaştırmalara ilişkin kat değişimi (Fold Change) değerleri ve istatistiki veriler Tablo 25'de gösterilmiştir.

Tablo 25. Sığır ve koyun orjinli hidatik kistlerde haplotip grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.

Haplotip Grubu	Örnek Sayısı	Grup	Hedef miRNA	Fold Change (Kat değişimi)	P Değeri	İstatistiki Fark
Hap_01			<i>egr-miR-7</i>	1	Kontrol	
Sığır Hap_01	31	Kontrol	<i>egr-miR-71</i>	1	Kontrol	Kontrol
Koyun Hap_03			<i>egr-miR-96</i>	1	Kontrol	
Hap_02					<i>egr-miR-7</i>	0.3700
Sığır Hap_02	2	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	1.1600	0.5505	Anlamsız
Koyun Hap_10			<i>egr-miR-96</i>	0.8500	0.5124	Anlamsız
Hap_03					<i>egr-miR-7</i>	0.0000
Sığır Hap_03	1	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	0.0000	0.0033	Anlamlı
			<i>egr-miR-96</i>	0.0000	0.0033	Anlamlı
Hap_04			<i>egr-miR-7</i>	0.0000	0.0032	Anlamlı
Sığır Hap_04	1	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	0.0000	0.0033	Anlamlı
			<i>egr-miR-96</i>	0.0000	0.0032	Anlamlı
Hap_05			<i>egr-miR-7</i>	1.2700	0.3566	Anlamsız
Sığır Hap_05	4	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	2.1900	0.0355	Anlamlı
Koyun Hap_02			<i>egr-miR-96</i>	3.5100	0.0123	Anlamlı
Hap_06			<i>egr-miR-7</i>	1.2100	0.4520	Anlamsız
Sığır Hap_06	14	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	0.8900	0.6268	Anlamsız
Koyun Hap_01			<i>egr-miR-96</i>	0.9400	0.7843	Anlamsız
Hap_07					<i>egr-miR-7</i>	0.0100
Sığır Hap_07	1	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	0.0100	0.0033	Anlamlı
			<i>egr-miR-96</i>	0.0100	0.0033	Anlamlı
Hap_08			<i>egr-miR-7</i>	0.2400	0.0097	Anlamlı
Sığır Hap_08	1	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	0.1800	0.0069	Anlamlı
			<i>egr-miR-96</i>	0.1500	0.0061	Anlamlı
Hap_09			<i>egr-miR-7</i>	0.0100	0.0033	Anlamlı
Sığır Hap_09	1	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	0.0000	0.0033	Anlamlı
			<i>egr-miR-96</i>	0.0000	0.0033	Anlamlı
Hap_10			<i>egr-miR-7</i>	0.4900	0.0451	Anlamlı
Sığır Hap_10	2	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	0.5200	0.0533	Anlamsız
			<i>egr-miR-96</i>	0.4400	0.0319	Anlamlı
Hap_11			<i>egr-miR-7</i>	6.7300	0.0060	Anlamlı
Sığır Hap_11	1	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	6.6800	0.0061	Anlamlı
			<i>egr-miR-96</i>	4.7900	0.0081	Anlamlı
Hap_12			<i>egr-miR-7</i>	4.2600	0.0093	Anlamlı
Sığır Hap_12	1	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	4.3700	0.0090	Anlamlı
			<i>egr-miR-96</i>	4.0000	0.0101	Anlamlı
Hap_13			<i>egr-miR-7</i>	0.0000	0.0032	Anlamlı
Sığır Hap_13	1	Çalışma	<i>egr-miR-71</i>	0.0000	0.0032	Anlamlı

Haplotip Grubu	Örnek Sayısı	Grup	Hedef miRNA	Fold Change (Kat değişimi)	P Değeri	İstatistiki Fark
Hap_14 Sığır Hap_14	1	Çalışma	egr-miR-96	0.0000	0.0032	Anlamlı
			egr-miR-7	1.4200	0.1989	Anlamsız
			egr-miR-71	1.0000	0.9897	Anlamsız
Hap_15 Sığır Hap_15	1	Çalışma	egr-miR-96	0.6200	0.1143	Anlamsız
			egr-miR-7	6.0400	0.0066	Anlamlı
			egr-miR-71	4.6500	0.0084	Anlamlı
Hap_16 Sığır Hap_16	1	Çalışma	egr-miR-96	3.1600	0.0147	Anlamlı
			egr-miR-7	0.0100	0.0034	Anlamlı
			egr-miR-71	0.0100	0.0033	Anlamlı
Hap_17 Sığır Hap_17	1	Çalışma	egr-miR-96	0.0000	0.0033	Anlamlı
			egr-miR-7	0.0800	0.0044	Anlamlı
			egr-miR-71	0.0400	0.0038	Anlamlı
Hap_18 Sığır Hap_18 Koyun Hap_04	4	Çalışma	egr-miR-96	0.0400	0.0037	Anlamlı
			egr-miR-7	2.6200	0.0219	Anlamlı
			egr-miR-71	2.8200	0.0185	Anlamlı
			egr-miR-96	4.1000	0.0098	Anlamlı
Hap_19 Sığır Hap_19	1	Çalışma	egr-miR-7	0.4600	0.0353	Anlamlı
			egr-miR-71	0.2500	0.0101	Anlamlı
			egr-miR-96	0.6700	0.1565	Anlamsız
Hap_20 Koyun Hap_05	1	Çalışma	egr-miR-7	5.4500	0.0072	Anlamlı
			egr-miR-71	10.6700	0.0047	Anlamlı
			egr-miR-96	10.5900	0.0047	Anlamlı
Hap_21 Koyun Hap_06	2	Çalışma	egr-miR-7	0.2900	0.0126	Anlamlı
			egr-miR-71	1.5000	0.1556	Anlamsız
			egr-miR-96	1.0500	0.8364	Anlamsız
Hap_22 Koyun Hap_07	1	Çalışma	egr-miR-7	0.4100	0.0266	Anlamlı
			egr-miR-71	0.9100	0.6957	Anlamsız
			egr-miR-96	11.6800	0.0045	Anlamlı
Hap_23 Koyun Hap_08	1	Çalışma	egr-miR-7	2.5200	0.0241	Anlamlı
			egr-miR-71	4.6100	0.0085	Anlamlı
			egr-miR-96	36.6000	0.0036	Anlamlı
Hap_24 Koyun Hap_09	1	Çalışma	egr-miR-7	7.4300	0.0057	Anlamlı
			egr-miR-71	10.7600	0.0047	Anlamlı
			egr-miR-96	4.6500	0.0084	Anlamlı
Hap_25 Koyun Hap_11	1	Çalışma	egr-miR-7	19.3000	0.0039	Anlamlı
			egr-miR-71	15.1900	0.0042	Anlamlı
			egr-miR-96	23.6400	0.0038	Anlamlı
Hap_26 Koyun Hap_12	1	Çalışma	egr-miR-7	0.6700	0.1609	Anlamsız
			egr-miR-71	1.0200	0.9444	Anlamsız
			egr-miR-96	1.3900	0.2247	Anlamsız
Hap_27 Koyun Hap_13	1	Çalışma	egr-miR-7	8.8900	0.0051	Anlamlı
			egr-miR-71	5.7000	0.0069	Anlamlı
			egr-miR-96	5.4400	0.0072	Anlamlı
Hap_28 Koyun Hap_14	1	Çalışma	egr-miR-7	3.7000	0.0113	Anlamlı
			egr-miR-71	1.7200	0.0845	Anlamsız
			egr-miR-96	0.8800	0.6096	Anlamsız
Hap_29 Koyun Hap_15	1	Çalışma	egr-miR-7	3.9800	0.0102	Anlamlı
			egr-miR-71	8.2700	0.0053	Anlamlı
			egr-miR-96	6.4300	0.0062	Anlamlı

5.4.5. *E. canadensis* (G6/7) Örneği ile Haplotip Grupları Arasında miRNA Ekspresyonu

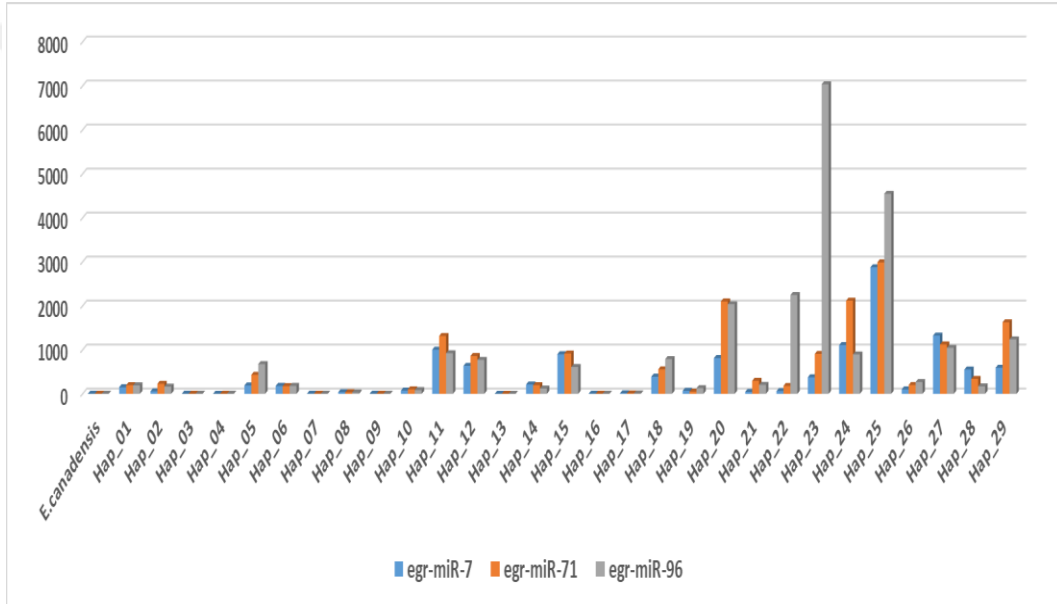
Sığır orjinli 40 ve koyun orjinli 41 olmak üzere toplam 81 hidatik kist örneğinin *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi olduğu ve 29 haplotip grubuna ayrıldığı, sığır orjinli bir örneğin ise, *E. canadensis* (G6/7) genotipi olduğu tespit edildi. *E. canadensis* (G6/7) genotipi olan örnek kontrol grubu olarak seçilerek, 29 haplotip grubuna ayrılan 81 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) örneğinin germinal membran yapısında, egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı.

Kontrol grubu olarak belirlenen *E. canadensis* (G6/7)'e kıyasla, Hap_07, Hap_09 ve Hap_16 haplotip gruplarında, egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamının ekspresyon düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. İstatistiki olarak fark tespit edilmeyen miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %10.345 (3/29), egr-miR-71 için %10.345 (3/29) ve egr-miR-96 için %10.345 (3/29) olarak belirlendi

E. canadensis (G6/7) genotipi olarak belirlenen kontrol grubuna kıyasla, Hap_03, Hap_04 ve Hap_13 haplotip gruplarında, egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamının ekspresyon düzeylerinde aşağı yönlü ekspresyon tespit edildi. Kontrol grubuna göre aşağı yönlü tespit edilen miRNA ekspresyon düzeyi farklılığı istatistiki olarak anlamlı bulundu. Aşağı yönlü tespit edilen miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %10.345 (3/29), egr-miR-71 için %10.345 (3/29) ve egr-miR-96 için %10.345 (3/29) olarak belirlendi.

Kontrol grubu olan *E. canadensis* (G6/7)'e kıyasla, Hap_01, Hap_02, Hap_05, Hap_06, Hap_08, Hap_10, Hap_11, Hap_12, Hap_14, Hap_15, Hap_17-

Hap_29 olmak üzere toplam 23 haplotip grubunda, egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamının ekspresyon düzeylerinde 7.14 kattan 7036 kata kadar değişen oranlarda yukarı yönlü ekspresyon tespit edildi. Kontrol grubuna göre yukarı yönlü tespit edilen miRNA ekspresyon düzeyi farklılığı istatistiki olarak anlamlı bulundu. Yukarı yönlü tespit edilen miRNA ekspresyon düzeyi genel olarak egr-miR-7 için %79.31 (23/29), egr-miR-71 için %79.31 (23/29) ve egr-miR-96 için %79.31 (23/29) olarak belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. *E. canadensis* (G6/7) örneği ile tüm haplotip grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri (*E. canadensis* (G6/7) kontrol grubu).

E. granulosus s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenen, sığır orjinli 40 ve koyun orjinli 41 olmak üzere toplam 81 örneğin bulunduğu 29 haplotip grubu ile sığır orjinli *E. canadensis* (G6/7) genotipi tespit edilen örnek arasındaki egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeylerindeki karşılaştırmalara ilişkin kat değişimi (Fold Change) değerleri ve istatistiki veriler Tablo 26'da gösterilmiştir.

Tablo 26. *E. canadensis* (G6/7) örneği ile bütün haplotip grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri ve istatistiki farkları.

Haplotip Grubu, <i>E. canadensis</i> (G6/7)	Örnek Sayısı	Grup	Hedef miRNA	Fold Change (Kat değişimi)	P Değeri	İstatistiki Fark
<i>E. canadensis</i> (G6/7)	1	Kontrol	egr-miR-7	1	Kontrol	
			egr-miR-71	1	Kontrol	Kontrol
			egr-miR-96	1	Kontrol	
Hap_01	31	Çalışma	egr-miR-7	148.94	0.003	Anlamlı
Sığır Hap_01			egr-miR-71	196.70	0.003	Anlamlı
Koyun Hap_03			egr-miR-96	192.24	0.003	Anlamlı
Hap_02	2	Çalışma	egr-miR-7	54.39	0.004	Anlamlı
Sığır Hap_02			egr-miR-71	227.78	0.003	Anlamlı
Koyun Hap_10			egr-miR-96	163.51	0.003	Anlamlı
Hap_03	1	Çalışma	egr-miR-7	0.38	0.021	Anlamlı
Sığır Hap_03			egr-miR-71	0.38	0.022	Anlamlı
			egr-miR-96	0.33	0.016	Anlamlı
Hap_04	1	Çalışma	egr-miR-7	0.11	0.005	Anlamlı
Sığır Hap_04			egr-miR-71	0.32	0.015	Anlamlı
			egr-miR-96	0.21	0.008	Anlamlı
Hap_05	4	Çalışma	egr-miR-7	188.61	0.003	Anlamlı
Sığır Hap_05			egr-miR-71	431.39	0.003	Anlamlı
Koyun Hap_02			egr-miR-96	675.27	0.003	Anlamlı
Hap_06	14	Çalışma	egr-miR-7	179.75	0.003	Anlamlı
Sığır Hap_06			egr-miR-71	174.76	0.003	Anlamlı
Koyun Hap_01			egr-miR-96	180.02	0.003	Anlamlı
Hap_07	1	Çalışma	egr-miR-7	1.34	0.272	Anlamsız
Sığır Hap_07			egr-miR-71	1.33	0.279	Anlamsız
			egr-miR-96	1.00	0.985	Anlamsız
Hap_08	1	Çalışma	egr-miR-7	36.16	0.004	Anlamlı
Sığır Hap_08			egr-miR-71	34.85	0.004	Anlamlı
			egr-miR-96	28.78	0.004	Anlamlı
Hap_09	1	Çalışma	egr-miR-7	0.80	0.383	Anlamsız
Sığır Hap_09			egr-miR-71	0.78	0.329	Anlamsız
			egr-miR-96	0.53	0.060	Anlamsız
Hap_10	2	Çalışma	egr-miR-7	73.22	0.003	Anlamlı
Sığır Hap_10			egr-miR-71	101.46	0.003	Anlamlı
			egr-miR-96	84.59	0.003	Anlamlı
Hap_11	1	Çalışma	egr-miR-7	1003.10	0.003	Anlamlı
Sığır Hap_11			egr-miR-71	1314.06	0.003	Anlamlı
			egr-miR-96	921.54	0.003	Anlamlı
Hap_12	1	Çalışma	egr-miR-7	635.08	0.003	Anlamlı
Sığır Hap_12			egr-miR-71	858.72	0.003	Anlamlı
			egr-miR-96	769.78	0.003	Anlamlı
Hap_13	1	Çalışma	egr-miR-7	0.09	0.005	Anlamlı
Sığır Hap_13			egr-miR-71	0.14	0.006	Anlamlı
			egr-miR-96	0.13	0.005	Anlamlı
Hap_14	1	Çalışma	egr-miR-7	212.15	0.003	Anlamlı
Sığır Hap_14			egr-miR-71	196.10	0.003	Anlamlı
			egr-miR-96	119.90	0.003	Anlamlı

Haplotip Grubu, <i>E. canadensis</i> (G6/7)	Örnek Sayısı	Grup	Hedef miRNA	Fold Change (Kat değişimi)	P Değeri	İstatistikî Fark
Hap_15 Sığır Hap_15	1	Çalışma	egr-miR-7	899.12	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	915.65	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	608.21	0.003	Anlamli
Hap_16 Sığır Hap_16	1	Çalışma	egr-miR-7	1.59	0.119	Anlamsız
			egr-miR-71	1.28	0.333	Anlamsız
			egr-miR-96	0.95	0.832	Anlamsız
Hap_17 Sığır Hap_17	1	Çalışma	egr-miR-7	11.30	0.005	Anlamli
			egr-miR-71	8.08	0.005	Anlamli
			egr-miR-96	7.14	0.006	Anlamli
Hap_18 Sığır Hap_18 Koyun Hap_04	4	Çalışma	egr-miR-7	390.09	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	555.02	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	788.83	0.003	Anlamli
Hap_19 Sığır Hap_19	1	Çalışma	egr-miR-7	67.78	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	49.10	0.004	Anlamli
			egr-miR-96	128.39	0.003	Anlamli
Hap_20 Koyun Hap_05	1	Çalışma	egr-miR-7	812.28	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	2099.34	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	2035.87	0.003	Anlamli
Hap_21 Koyun Hap_06	2	Çalışma	egr-miR-7	43.20	0.004	Anlamli
			egr-miR-71	294.90	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	201.98	0.003	Anlamli
Hap_22 Koyun Hap_07	1	Çalışma	egr-miR-7	61.37	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	178.97	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	2245.13	0.003	Anlamli
Hap_23 Koyun Hap_08	1	Çalışma	egr-miR-7	375.22	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	906.59	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	7036.38	0.003	Anlamli
Hap_24 Koyun Hap_09	1	Çalışma	egr-miR-7	1106.33	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	2115.93	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	894.40	0.003	Anlamli
Hap_25 Koyun Hap_11	1	Çalışma	egr-miR-7	2875.06	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	2987.68	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	4544.74	0.003	Anlamli
Hap_26 Koyun Hap_12	1	Çalışma	egr-miR-7	100.06	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	200.01	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	267.10	0.003	Anlamli
Hap_27 Koyun Hap_13	1	Çalışma	egr-miR-7	1323.41	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	1121.16	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	1045.67	0.003	Anlamli
Hap_28 Koyun Hap_14	1	Çalışma	egr-miR-7	550.97	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	338.39	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	169.75	0.003	Anlamli
Hap_29 Koyun Hap_15	1	Çalışma	egr-miR-7	592.53	0.003	Anlamli
			egr-miR-71	1626.12	0.003	Anlamli
			egr-miR-96	1236.65	0.003	Anlamli

6. TARTIŞMA

Echinococcus granulosus'un sebep olduğu KE, dünya genelinde insanlarda ve hayvanlarda görülen zoonoz bir hastalıktır. Hastalık, hayvanların çeşitli organ ve dokularında oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar sonucu ekonomik kayıpların oluşmasına, insanlarda ise yerleştiği organ ve dokulara bağlı olarak ciddi ve bazen ölümcül olabilecek durumlara neden olabilmektedir (142).

KE'e sebep olan *E. granulosus*'un moleküler çalışmalar neticesinde yeniden tanımlanması sonucunda bugüne kadar bilinen türlerle ilgili büyük değişiklikler meydana gelmiştir. Yakın zamana kadar, *E. granulosus* tek bir tür olarak kabul edilirken, şimdi patolojide farklılıklar gösteren, ilaçlara farklı tepkiler veren ve geniş genetik çeşitliliğe sahip olduğu kabul edilen farklı türler tanımlanmıştır (61). Gelecekte yapılacak çalışmalar ile özellikle Afrika ve Çin gibi bölgelerde parazitlerin yaban hayatında da araştırılması neticesinde yeni *Echinococcus* türlerinin keşfedilmesi beklenmektedir.

E. granulosus'un farklı izolatları arasında görülen genetik farklılıklar hastalığın yoğun olarak görüldüğü bölgelerde, etkenin patojenitesi, bulaş yolu, hastalıkla ilgili yapılacak olan kontrol ve mücadele yöntemleri konularında etkili olmaktadır (143). Ülkemizde ve dünyada *E. granulosus* genotip ve haplotiplerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Şimşek ve ark. (75), Erzurum ilinde yaptıkları bir çalışmada, 220 sığır orjinli hidatik kist örneğini, 12S rRNA gen bölgesine yönelik PCR ve mt-CO1 gen bölgesine yönelik, DNA dizi analizleri ile incelemişler, analizler neticesinde; örneklerden 147'sinin *E. granulosus* s.s. (G1-G3), 28'inin G1, kalan 73 örnekten 7'sinin G3 suşu olduğunu saptamışlardır.

Şimşek ve ark. (76), yaptıkları bir diğer araştırmada, Elazığ ve Erzurum illerinden, 23 sığır ve 31 koyun orjinli hidatik kist örneğini, PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) metodu kullanarak analiz etmişler, analizler neticesinde tüm örneklerin *E. granulosus* s.s. (G1-G3) olduğunu bildirmişlerdir. Gökpınar ve ark. (78), Kırıkkale ilinde yaptıkları bir araştırmada, sığır orjinli 20 hidatik kist materyalini, mt-CO1 genine yönelik PCR ve DNA dizi analizlerine tabi tutmuşlar ve analizler neticesinde tüm örneklerin *E. granulosus* s.s. (G1-G3) olduğunu belirlemişlerdir. Ütük ve ark. (69), Kilis ilinde yaptıkları bir çalışmada, koyun kökenli 28 hidatik kist izolatını incelemişler ve tüm izolatların *E. granulosus* s.s. (G1-G3) olduğunu bildirmişlerdir. Altıntaş ve ark. (144), Manisa’da yaptıkları bir araştırmada, 18 sığır kökenli hidatik kist izolatının incelenmesi neticesinde örneklerin hepsinin *E. granulosus* s.s. (G1-G3) olduğunu belirtmişlerdir. Özyalın (83), Malatya’da 53 insan izolatu üzerinde yaptığı bir araştırmada, mt-CO1 gen bölgesine yönelik PCR analizleri ve akabinde yapılan tek yönlü DNA dizi analizleri neticesinde, tüm izolatların *E. granulosus* s.s. (G1-G3) olduğunu raporlamıştır. Kesik ve ark. (86), Türkiye’nin farklı illerinden temin edilen sığır orjinli 60 hidatik kist örneğini, mt-CO1 genine yönelik PCR ve tek yönlü sekans analizleri ile incelemişler ve incelemeler neticesinde tüm örneklerin *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olduğunu belirlemişler ve bu örneklerin toplamda 49 nokta mutasyonu taşıdığını tespit etmişlerdir. Yan ve ark. (145), Çin’de KE için yüksek endemik eyaletlerden biri olan Xinjiang bölgesinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada, koyun ve sığır orjinli toplam 55 hidatik kist örneğini, 12S rRNA ve mt-CO1 gen bölgelerine spesifik PCR ve akabinde sekans analizleri ile incelemişler ve neticede tüm örneklerin *E. granulosus* s.s. (G1 genotipi) olduğunu belirlemişlerdir. mt-CO1

gen tabanlı yaptıkları analizlerde 20 haplotip tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Mehmood ve ark. (146), İtalya'da KE yönünden oldukça endemik olan Sardinya bölgesinde *E. granulosus* s.s.'nin intraspesifik değişkenliğini ve demografik yapısını incelemek için yaptıkları bir araştırmada, 52 koyun, 11 sığır, 4 domuz ve 2 keçi orjinli toplam 69 hidatik kist izolatını incelemişlerdir. İnceledikleri örneklerde, baskın genotiplerin G1 ve G3 olduğunu belirlemişlerdir. Yaptıkları haplotip analizleri sonucunda, nispeten yüksek oranda 22 haplotip grubu (0.8555 ± 0.033) ve düşük nükleotid çeşitliliği (0.00281 ± 0.00030) olan intraspesifik varyasyonlar tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada analizi yapılan 41 sığır hidatik kist izolatı, mt-CO1 gen bölgesine yönelik yapılan PCR ve sekans analizleri ile değerlendirilmiştir. Neticede, 40 sekansın *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olduğu belirlenmiştir. Sığır izolatlarının kendi içerisinde yapılan haplotip analizleri neticesinde, bir ana haplotip ile konfigürasyon içinde düzenlenmiş, 1-17 mutasyon adımıyla diğer haplotiplerden ayrılmış ve toplam izolatların %30'unu (12/40) kapsayan 19 haplotip grubu tespit edilmiştir. mt-CO1 sekansları için %47.05 (8/17)'i parsimony informative olan 17 polimorfik alan belirlenmiş ve gen bölgesi için yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği gözlenmiştir. Bu haplotip gruplarının %73.68 (14/19)'sinin tekli haplotip olması bu sonuçları desteklemiştir. Yine bu çalışmada değerlendirilen 41 koyun hidatik kist izolatı, mt-CO1 gen bölgesine yönelik yapılan PCR ve sekans analizleri sonucunda, 41 sekansın tamamının *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olduğu belirlenmiştir. Koyun izolatlarının kendi içlerinde yapılan haplotip analizleri neticesinde; bir ana haplotip ile konfigürasyon içinde düzenlenmiş, 1-19 mutasyon adımıyla diğer haplotiplerden ayrılmış ve toplam izolatların %47.05'ini

(15/41) kapsayan 15 haplotip grubu tespit edilmiştir. mt-CO1 sekansları için %36.8 (7/19)'i parsimony informative olan 19 polimorfik alan belirlenmiş, gen bölgesi için yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği gözlenmiştir. Bu haplotip gruplarının %73.33 (11/15)'sinin tekli haplotip olması bu sonuçları desteklemiştir. *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) hem sığır (n=40) hem koyun (n=41) izolatlarının mt-CO1 gen bölgesi için haplotip analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen haplotip ağı sonucunda, bir ana haplotip ile konfigürasyon içinde düzenlenmiş, 1-26 mutasyon adımıyla diğer haplotiplerden ayrılmış ve toplam izolatların %38.27'sini (31/81) kapsayan 29 haplotip grubu belirlenmiştir. mt-CO1 sekansları için %50 (13/26)'si parsimony informative olan 26 polimorfik alan tespit edildi ve gen bölgesi için yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği olduğu gözlenmiştir. Bu haplotip gruplarının %75.86 (22/29)'sinin tekli haplotip olması sonuçları desteklemiştir. Bu çalışmada elde edilen genotip sonuçları ile Şimşek ve ark. (75; 76), Gökpınar ve ark. (78), Ütük ve ark. (69), Altintas ve ark. (144), Özyalın (83), Kesik ve ark. (86), Yan ve ark. (145), Mehmood ve ark. (146)'nın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Ülkemizin farklı bölgelerinde *E. granulosus*'un genotiplerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, etkene ara konak olarak aracılık eden insanlarda ve hayvanlarda genotipin ağırlıklı olarak *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olduğu görülmektedir. Sunulan çalışmada da toplam 81 hidatik kist izolatından 80'inin (40 sığır, 41 koyun) *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olduğu belirlenmiştir. Yine sunulan çalışmada, hem sığır hemde koyun orjinli hidatik kist örneklerinde yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği belirlenmiştir. Bu durumun, etkenin endemik olduğu bölgelerde son konak ve ara konaklar arasında iletiminin sürekli devam etmesi, ara konak ve son konak olan hayvan türlerinin

ülkemizde çok farklı türde olmaması, bu sayede etkenin genetik yapısının korunması ile bağlantılı olabileceği düşünülmüştür.

Eryıldız ve Sakru (79), Trakya bölgesinde farklı konak türlerine ait hidatik kist örneklerini inceledikleri bir çalışmada, 13 sığır, 3 koyun ve 42 insan orjinli hidatik kist izolatını PCR-RFLP ve PCR-SSCP analizleri ve ITS-1 ve NAD1 gen bölgelerine yönelik DNA dizi analizleri ile incelemişlerdir. Analizler neticesinde tüm sığır ve koyun izolatlarının yaygın koyun suşu (G1), tüm insan izolatlarının ise G1 ve G7 suşları olduğunu belirlemişlerdir. Kesik ve ark. (84), Elazığ ilinde yaptıkları bir çalışmada sığır orjinli 40 hidatik kist örneğini, mt-CO1 genine yönelik PCR ve akabinde yaptıkları DNA dizi analizleri ile incelemeleri neticesinde, örneklerden 39'unun *E. granulosus* s.s., birinin ise *E. canadensis* (G6/7) olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, *E. granulosus* s.s. olduğu belirlenen 39 örnek üzerinde yaptıkları haplotip analizleri neticesinde, 26 haplotip olduğunu ve bu haplotiplerde 29 polimorfik bölge belirlediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarını ile Türkiye'de sığırlarda *E. canadensis* (G6/7)'in ilk bildirimini yapmışlardır. Mehmood ve ark. (85), Elazığ'da yaptıkları bir çalışmada, 19 koyun ve 66 sığır olmak üzere toplam 85 hidatik kist izolatını, mt-CO1 genine yönelik PCR ve DNA dizi analizleri ile incelemişler ve analizler neticesinde 85 izolattan 84'ünün *E. granulosus* s.s., bir koyun izolatının ise *E. canadensis* (G6/7) olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarını ile Türkiye'de ilk kez koyunlarda *E. canadensis* (G6/7)'in varlığını raporlamışlardır. Yaptıkları haplotip analizleri sonucunda 66 sığır izolatında, 16 haplotip; 19 koyun izolatında ise 7 haplotip belirlemişlerdir. Bakal ve ark. (87), Elazığ'da yaptıkları bir araştırmada, insan orjinli 17 hidatik kist izolatını, mt-CO1 genine yönelik PCR ve sekans analizlerine

tabi tutmuşlar ve 16 izolatin *E. granulosus* s.s., bir izolatin ise *E. canadensis* (G6/7) olduğunu belirtmişlerdir. Türkiye'deki pediatrik olgularda *E. canadensis* (G6/7) suşunun ilk kez bu araştırma ile bildirimini yapıldığını raporlamışlardır.

Sunulan bu çalışmada değerlendirilen 82 hidatik kist izolatından (41 sığır, 41 koyun), mt-CO1 gen bölgesine yönelik yapılan PCR ve sekans analizleri sonucunda, 80 izolatin *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olduğu tespit edilmiş, bir sığır orjinli izolatin ise *E. canadensis* (G6/7) olduğu belirlenmiştir. Sunduğumuz çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar ile Eryıldız ve Sakru (79), Kesik ve ark. (84), Mehmood ve ark. (85), Bakal ve ark. (87)'nin çalışmalarında elde ettikleri sonuçlar uyumluluk göstermektedir. Bahsedilen çalışmalarda sığır ve koyun hatta insan orjinli hidatik kist örneklerinde genotipin yüksek oranda *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olduğu, yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği sergilediği, düşük oranda *E. canadensis* (G6/7) genotipinin görüldüğü bildirilmiştir. Sığır ve koyunlarda *E. granulosus* etkeninin genotiplerini belirlemeye yönelik ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalarda baskın genotipin *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olduğu görülmektedir. *E. canadensis* (G6/7) genotipinin sunduğumuz çalışmada ve Eryıldız ve Sakru (79), Kesik ve ark. (84), Mehmood ve ark. (85), Bakal ve ark. (87)'nin çalışmalarında çok düşük oranlarda belirlendiği görülmektedir. Bu durumun, etkenin biyolojisinde *E. canadensis* (G6/7) genotipi için ara konak olan domuz ve deve popülasyonunun Türkiye'de diğer ara konak hayvan türlerine göre daha az olması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

E. granulosus'un yaşam döngüsünde konak ve parazitin birlikte yaşamasının altında yatan mekanizmalar halen tam olarak belirlenememiştir. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, parazitlerin konaklarda hayatta kalması ile

ilgili stratejileri belirlemeye yöneliktir (92). Kist özelliklerinin KE serolojisini etkilediği birkaç çalışma bildirilse de KE gelişimi ve ilerlemesi sırasında konakta meydana gelen mekanizmalar hakkında hala sınırlı veri bulunmaktadır. *E. granulosus*'un yaşam döngüsünde konak ve parazit ilişkisindeki mekanizmaları açıklamaya çalışan en yeni yaklaşımlardan biri de mikroRNA'lardır (101). Epigenetik düzenleyiciler olarak miRNA'lar, biyolojik fonksiyonları kontrol etmek için transkripsiyon sonrası ökaryotlarda gen ekspresyonunu düzenleyen küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır. miRNA'lar, parazitlerin gelişimi, fizyolojisi, enfeksiyonu, bağışıklığı ve karmaşık yaşam döngülerinde rol oynamaktadırlar. Parazitler, konak miRNA profilini ve ekspresyon seviyesini değiştirerek parazitlerin konakta kontrolüne/konaktan atılmasına veya enfeksiyonun şiddetinin artmasına neden olabilmektedir. Son 20 yılda, *Caenorhabditis elegans* ve diğer parazitlerde binlerce miRNA tanımlanmıştır. Bu nedenle, miRNA yolları paraziter hastalıkların teşhisi ve terapötik kontrolü için potansiyel hedefler arasında yer almaktadır (147).

Echinococcus spp. genomunun yaklaşık %10-14'lük kısmını protein kodlayan genler (exon) oluşturmasına rağmen, genomun yaklaşık %85'lik kısmını protein kodlamayan (non-coding (intron)) RNA'lar oluşturmaktadır (30; 95). Son yıllarda miRNA'lar *E. granulosus*, *E. multilocularis* ve *E. canadensis* gibi türlerde de tanımlanmıştır. Bu bilgiler, miRNA'ların, *Echinococcus* spp. ve KE'de önemli bir yerinin olduğunu ve bu nedenle teşhis veya tedavi hedefleri olarak kullanılabilme potansiyelinin olabileceğini düşündürmektedir (99).

Bu çalışmada farklı ara konak türlerinde (sığır ve koyun), *Echinococcus* spp. genotiplerinin ve genotipler içerisindeki haplotipler belirlenerek, genotip ve

haplotip grupları arasında ve aynı zamanda farklı kist yapılarında (germinal membran ve/veya protoskoleks) miRNA ekspresyon seviyeleri tespit edildi. Sığır orjinli 41 ve koyun orjinli 41 olmak üzere toplam 82 hidatik kist izolatından, germinal membran örnekleri alınarak, *E. granulosus* s.l. mt-CO1 gen bölgesine spesifik primerler ile PCR ve DNA dizi analizleri gerçekleştirildi. Bu analizler ile hem hidatik kist örneklerinin tür tayini hem de haplotipleri belirlendi.

Alizadeh ve ark. (148), egr-miR-71 ve egr-let-7 miRNA'larının kist hidatik hastalığı için plazma biyobelirteçleri olarak kullanılabilme kapasitelerinin araştırılması amacıyla yaptıkları bir çalışmada, KE olduğu belirlenen 30 insandan, kontrol grubu için ise sağlıklı 30 bireyden kan örnekleri toplamışlardır. KE hastalarındaki kan örneklerinde, egr-miR-71 ve egr-let-7 miRNA'larının ekspresyon seviyelerini kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. KE cerrahisinden sonra hastalar üç ve altı aylık dönemde takip edilerek, hasta ve kontrol grubu arasındaki miRNA nisbi kat değişimi karşılaştırılmış, house keeping internal kontrol geni olarak ise hsa-miR-16-5p kullanılmıştır. İnternal kontrol geni olan hsa-miR-16-5p'ye göre ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu sağlanmıştır. Analizler neticesinde, parazit türevli miRNA'lardan egr-miR-71 ve egr-let-7'nin insan plazmasında tespit edilebildiği gösterilmiştir. miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler değerlendirildiğinde özellikle egr-miR-71'in kist hidatiğin erken teşhisi ve izlenmesi bakımından, yeni, umut verici sonuçlar verdiği ve biyobelirteç olarak işlev görebileceği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da sığır ve koyun kökenli hidatik kist örneklerinde (germinal membran ve protoskoleksler) egr-miR-71'in anlamlı bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiş olup, egr-miR-71'in KE tanısında etkili bir biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür.

Mortezaei ve ark. (149), *E. granulosus*'un farklı gelişim evrelerinde miRNA profilinin araştırılması amacıyla yaptıkları bir çalışmada, parazitin farklı gelişim evrelerini, ex vivo ve in-vitro olarak kültürlenmiş *E. granulosus*'tan elde etmişlerdir. miRNA'ların ekspresyon seviyelerini, ex vivo germinal membran, evagine protoskoleks, in-vitro mikrokist ve strobilasyonlu erişkin parazitlerde araştırmışlardır. Germinal membran yapısında, protoskoleks transformasyonu sırasında, miR-61'in ekspresyonunda artış gözleendiği, erişkin strobilat formlarda miR-10'un daha yüksek düzeyde eksprese edildiğini bildirmişlerdir. Germinal tabakada, let-7 ve miR-3489 miRNA'larının daha yüksek düzeyde eksprese edildiğini belirtmişlerdir. Bu da göstermektedir ki *E. granulosus*'tan hidatik kist formasyonu şekillenirken her aşamada farklı miRNA'lar değişik düzeylerde eksprese olmaktadır. Nitekim bizim çalışmamızda da fertil koyun kökenli hidatik kist izolatlarının tamamında, germinal membranlarda protoskolekslere kıyasla egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96'nın tamamının ekspresyonunda istatistiki olarak anlamlı artış tespit edildi. Akıl (150), KE teşhisi konulmuş olan insanlarda ve sağlıklı bireylerde egr-let-7, egr-miR-10 ve egr-miR-71'in ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması amacıyla yaptığı bir çalışmada, KE teşhisi konulmuş 50 bireyden ve 20 sağlıklı bireyden kan örnekleri almıştır. Normalizasyon için referans gen (housekeeping gene) olarak U6 small nuclear RNA (snRNA) kullanılmış, hasta grubundaki miRNA ekspresyon seviyelerini, kontrol grubu ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre karşılaştırarak hesaplamıştır. qRT-PCR yöntemi ile hasta örneklerinde egr-let-7, egr-miR-10 ve egr-miR-71 için sırasıyla 27 (%54), 5 (%10) ve 13 (%26)'ünde ekspresyon görüldüğü tespit edilmiş, sağlıklı kontrol grubunda hedef miRNA'larda ekspresyon tespit edilmemiştir. KE'li hastaların plazma örneklerinde *E. granulosus*

kaynaklı egr-let-7, egr-miR-10 ve egr-miR-71 miRNA'larının tespit edilebildiği bildirilmiş, kist sınıflandırmalarına göre, miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler göz önüne alındığında özellikle KE1 kist tipinde egr-miR-71, KE2'de egr-let-7'nin KE'in erken tanısı için biyobelirteç adayı olabileceği belirtilmiştir. Örsten ve ark. (151), aktif ve inaktif kistleri olan KE teşhisi konulmuş insanlarda, parazit türevli miRNA'ların ekspresyon profillerini karşılaştırmak için yaptıkları bir çalışmada, 55 enfekte ve 15 sağlıklı bireyden kan örnekleri almışlardır. Aktif kist teşhis edilen KE hastalarında parazit türevli miRNA'lardan, egr-let-7-5p, egr-miR-71a-5p ve egr-miR-9-5p'nin inaktif KE hastalarına göre ekspresyon düzeylerinin sırasıyla 3.74, 2.72 ve 20.78 kat fazla olacak şekilde eksprese edildiği ve bu nisbi kat artış farklarının istatistiki olarak önemli olduğu ($p < 0.05$) raporlanmıştır. Analizler neticesinde egr-let-7-5p ve egr-miR-9-5p miRNA'larının, aktif ve inaktif KE'in ayırıcı tanısı için umut verici potansiyel biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızda 10 koyun orijinli fertil olan hidatik kist örneğinde protoskoleks ve germinal membran yapılarında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının, ekspresyon seviyelerinde nisbi kat değişimleri karşılaştırılmıştır. Aktif hidatik kisti olan koyun örneklerinde egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'ları arasındaki nispi kat değişiminin belirlenmesi için internal kontrol (house keeping) geni olarak U6 kullanılmıştır. Koyun orijinli 10 hidatik kist örneğine ait germinal membran ve protoskoleks yapılarındaki miRNA ekspresyon düzeyleri hem bireysel olarak ayrı ayrı, hem de 10 örneğin germinal membran ve protoskoleks yapılarındaki ekspresyon düzeylerinin ortalaması alınarak kıyaslamalar yapılmıştır. Yapılan karşılaştırmaların tamamında fertil olan koyun orijinli hidatik kist örneklerinde kontrol olarak seçilen protoskoleks yapısına

kıyasla germinal membran yapısında, egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamının ekspresyon seviyesinde istatistiki olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir yükseliş belirlenmiştir. Mortezaei ve ark. (149)'nın yaptıkları çalışmada, protoskoleks üretim aşamasında, germinal membran yapısında miR-61, let-7 ve miR-3489'un ekspresyonunda yükselme görüldüğü bildirilmektedir. Bu çalışmada da, germinal membran yapısındaki egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamının ekspresyon seviyesinde protoskoleks yapısına kıyasla artış olduğu belirlenmiştir. Germinal membran yapısında, protoskoleks yapısına kıyasla daha yüksek düzeyde miRNA ekspresyonu tespit edilmesi yönüyle, çalışmamızdaki sonuçlar Mortezaei ve ark. (149)'nın çalışmasındaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Alizadeh ve ark. (148)'nin yaptığı çalışmada insanlarda KE teşhisi için egr-miR-71'in biyobelirteç adayı olabileceği belirtilmiştir. Akıl (150)'in yaptığı çalışmada, KE1 aşamasındaki kist tipinde egr-miR-71, KE2 aşamasındaki kist tipinde egr-let-7'nin KE'in erken tanısı için biyobelirteç adayı olabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96'nın KE teşhisinde biyobelirteç adayı olabileceği sonucuna varılmıştır. egr-miR-71'in aktif KE teşhisinde biyobelirteç adayı olarak kullanılabilmesi sonucu bakımından sunduğumuz çalışma; Alizadeh ve ark. (148), Akıl (150) ve Örsten ve ark. (151)'nin sonuçları ile benzerlik göstermektedir. egr-mir-71'in benzer çalışmalarda KE'in tanısı için özellikle aktif ve inaktif kistlerde ayırım için biyobelirteç adayı olarak gösterilmesindeki temel neden, egr-mir-71'in Nemo-like kinase gen bölgesini hedef alması, protoskoleks gelişimine dahil olması ve *Echinococcus* türlerinde konak makrofaj fonksiyonlarını düzenlemesi özellikleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Cucher ve ark. (93), *E. granulosus*'un farklı gelişim aşamalarındaki ve genotiplerindeki miRNA ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, protoskoleks örneklerini domuz ve sığırların akciğer ve karaciğerlerinden elde etmişlerdir. *E. granulosus* (G1 genotipi) protoskolekslerini farelere intraperitoneal olarak enjekte etmişler, enjeksiyondan 9 ay sonra farelere ötenazi işlemi uygulayıp intraperitoneal kistleri toplamışlardır. G7 genotipi olarak belirledikleri protoskoleks örneklerini yüksek glikoz içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içerisinde kültüre etmişlerdir. Farklı gelişim aşamalarındaki miRNA ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak için protoskoleks ve germinal membran örneklerinden qRT-PCR ve Real Time PCR analizleri gerçekleştirmişlerdir. Analizler neticesinde miR-2, miR-71, miR-9, miR-10, let7 ve miR-277 miRNA'larının, sekonder hidatik kistlerde, hem protoskoleks (G1 ve G7 genotipleri) hem de kist duvarlarında, miR125'in ise sadece protoskoleks yapısında eksprese olduğu bildirilmiştir. İn vitro pre-mikrokistler ve mikrokistlerde miRNA ekspresyon seviyelerini incelediklerinde, miR-2 ve miR-71'in her iki veziküler formda, miR-125'in ise sadece pre-mikrokistlerde eksprese edildiği, miR-125'in kist aşamasında eksprese olmadığı veya Northern blot ile tespit edilebilecek düzeyde ekspresyon seviyesinin oluşmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca, metasestod formunda miR-2, miR-71 ve let-7'nin protoskolekslerdeki ekspresyon düzeyinin, germinal membran yapısındaki ekspresyon düzeyine göre daha yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir. Bu durum, miRNA ekspresyon düzeyinin parazitin gelişim sürecini düzenleyebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenen koyun orjinli, fertil 10 örnekten germinal membran ve protoskoleks örnekleri

alınmış ve bu yapılardaki egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96'nın ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Koyun orjinli 10 örneğin tamamında protoskoleks yapısına kıyasla germinal membran yapısında, egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamında çok yüksek düzeyde ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Özellikle egr-miR-96'da, egr-miR-7 ve egr-miR-71'e kıyasla ekspresyon düzeyinin çok daha fazla olduğu gözlenmiştir. Sığır orjinli *E. canadensis* (G6/7) genotipi olduğu belirlenen bir hidatik kist örneği ile sığır koyun orjinli 81 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi örneklerini içeren 29 haplotip grubu arasında, egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon seviyelerindeki kat değişimleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada, diğer örneklerden farklı genotip içerdiğinden *E. canadensis* (G6/7) örneği kontrol olarak seçilmiş ve miRNA ekspresyon seviyelerinde kıyaslamalar buna göre yapılmıştır. Kontrol olarak seçilen *E. canadensis* (G6/7) örneğine göre, 29 haplotip grubunun 23'ünde (%79.31), egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamının ekspresyon seviyelerinde artış kaydedilmiştir. Bu durum genel olarak miRNA ekspresyon düzeylerinin *E. canadensis* (G6/7) genotipinde, *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3)'e göre daha düşük olabileceğini düşündürmektedir. Cucher ve ark. (93)'nin gerçekleştirdikleri çalışmada protoskoleksde (G1 genotipi), egr-miR-71 ve egr-let-7'nin daha yüksek düzeyde eksprese edildiği belirlenirken, sunulan bu çalışmada germinal membran yapısında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının daha yüksek düzeyde eksprese olduğu saptanmıştır. Bu durum, protoskolekslerin deneysel sekonder hidatidozis oluşturulması için farelere enjeksiyonu ile etkenin konak değişiminden dolayı miRNA ekspresyon seviyesinde değişimler olabileceğini düşündürmektedir. Cucher ve ark. (93)'nin

protoskoleksleri (G7 genotipi), DMEM içeren kültür ortamında in-vitro geliştirilerek elde ettikleri pre-mikrokist ve mikrokistlerde, germinal membran yapısında, protoskoleks yapısına kıyasla egr-miR-71 ve egr-let-7'nin daha düşük düzeyde eksprese olduğunu belirlemişlerdir. Sunduğumuz çalışmada genotip farklılığında miRNA ekspresyon düzeylerinin büyük oranda değiştiği belirlendiğinden, Cucher ve ark. (93)'nin çalışmasındaki miRNA ekspresyon sonuçlarındaki farklılığın, etkenin genotip farklılığından kaynaklanabileceği ve yine etkenin in-vitro ortamda üretilerek elde edilmesinin, miRNA ekspresyon düzeylerinde değişimlere sebep olabileceği düşünülmektedir.

E. granulosus genotip ve haplotiplerinin belirlenerek, miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı çalışmalar hali hazırda sınırlı sayıda olduğundan elde edilen veriler ilgili literatürlerin verileriyle karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile PCR ve DNA dizi analiziyle 41 sığır ve 41 koyun orjinli toplam 82 hidatik kist örneği incelenmiştir. Analizler neticesinde 40 sığır ve 41 koyun orjinli toplam 81 hidatik kist örneği *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi olarak belirlenmiştir. Sığır orjinli bir hidatik kist örneğinin ise *E. canadensis* (G6/7) genotipi olduğu tespit edilmiştir. Sığır orjinli 40 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) örneğinde yapılan haplotip analizleri neticesinde, 19 haplotip grubu, bu gruplarda toplam 17 polimorfik alan olduğu, örneklerin yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği gösterdiği belirlenmiştir. Koyun orjinli 41 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) örneğinde yapılan haplotip analizleri neticesinde, 15 haplotip grubu, bu gruplarda toplam 19 polimorfik alan olduğu, örneklerin yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği gösterdiği belirlenmiştir. Koyun ve sığır orjinli toplam 81 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) genotipi olduğu belirlenen örneklerin toplamda

29 haplotip grubuna ayrıldığı, bu gruplarda toplam 26 polimorfik alan olduğu, örneklerin yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği gösterdiği belirlenmiştir. Sığır orjinli 40 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) örneğinde egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon seviyelerindeki kat değişimleri karşılaştırılmıştır. Sığır orjinli 40 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) örneğinde belirlenen Hap_01 ana haplotip grubuna göre, diğer haplotip gruplarında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96'nın ekspresyon düzeylerinde genel olarak yükselme görüldüğü saptanmıştır. Koyun orjinli 41 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) örneğinde egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon seviyelerindeki kat değişimleri karşılaştırılmıştır. Koyun orjinli 40 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) örneğinde belirlenen Hap_03 ana haplotip grubuna göre diğer haplotip gruplarında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96'nın ekspresyon düzeylerinde genel olarak düşüş görüldüğü belirlenmiştir. Fertil olduğu ve protoskoleks ihtiva ettiği belirlenen 10 koyun orjinli *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) hidatik kist örneğinde protoskoleks ve germinal membran yapılarındaki egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon düzeyleride kıyaslanmıştır. Yapılan karşılaştırmalarda, örneklerin tamamında, protoskoleks yapısına kıyasla, germinal membran yapısında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının çok daha yüksek düzeyde eksprese olduğu belirlenmiştir. Koyun ve sığır orjinli toplam 81 *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) örneğinde egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon seviyelerindeki kat değişimleri karşılaştırılmıştır. Koyun ve sığır orjinli örneklerde belirlenen Hap_01 ana haplotip grubuna göre diğer haplotip gruplarında egr-miR-7'nin ekspresyon seviyesinde genel olarak düşüş, egr-miR-71 ve egr-miR-96'nın ekspresyon seviyesinde genel olarak yükselme olduğu gözlenmiştir. Sığır

orjinli bir *E. canadensis* (G6/7) örneğinde egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının ekspresyon seviyelerindeki kat değişimleri bütün örneklerin yer aldığı 29 haplotip grubu ile kıyaslanmıştır. Koyun ve sığır orjinli toplam 81 hidatik kist örneğinin tamamı *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olduğundan dolayı farklı genotip olan bir sığır orjinli *E. canadensis* (G6/7) örneği kontrol grubu olarak seçilerek miRNA ekspresyon düzeylerindeki kat değişimleri karşılaştırılmıştır. egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının *E. canadensis* (G6/7)'e kıyasla 29 haplotip grubunda %79.31 (23/29) oranında yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği belirlendi.

Görüldüğü üzere haplotip çeşitliliği ile miRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı olan yükselme ve azalmalar görülebilmektedir. Özellikle *E. canadensis* (G6/7) ile tüm haplotiplerin kıyaslanmasında bu durum daha dikkat çekici olmuştur. Genotipleri *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) olarak belirlenen, koyun orjinli fertil 10 hidatik kist örneğinin protoskoleks ve germinal membran yapılarında egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamının ekspresyon düzeyinde, protoskoleks yapısına kıyasla germinal membran yapısında çok yüksek düzeyde eksprese olması önemli bulunmuştur. Germinal membran yapısında protoskoleks yapısına kıyasla özellikle egr-miR-96 miRNA'sının ekspresyonunun kat değişimi ortalama 350 kat artış göstermiştir.

Echinococcus spp. genomunda daha uzun veya farklı gen bölgelerindeki polimorfizmlerin belirlenerek, polimorfizm belirlenen gruplardaki miRNA ekspresyon düzeylerinin kıyaslanmasıyla da önemli sonuçlar alınması muhtemeldir.

egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının, özellikle protoskoleks yapısına kıyasla germinal membran yapısında yüksek ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. egr-miR-7, egr-miR-71 ve egr-miR-96 miRNA'larının tamamının aktif KE'te biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır. Özellikle yaklaşık 350 kat yüksek ekspresyon gösteren egr-miR-96'nın KE ile enfekte ve sağlıklı bireylerde kandaki ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve karşılaştırılmasının yapılması, bu miRNA'ların hastalık teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyellerinin belirlenebilmesi bakımından önem arz etmektedir. Bu tespitler için daha geniş kapsamlı yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.



7. KAYNAKLAR

1. Rickard MD, Lightowers MW. Immunodiagnosis of hydatid disease, in: Thompson RCA (Ed). The biology of Echinococcus and hydatid disease, George Allen and Unwin, London, 1986; 217- 249.
2. Şimşek S, Ütük AE, Köroğlu E. Hidatik kist sıvısından Antijen B (Agb)'nin kısmi purifikasyonu ve koyun hidatidosisinin tanısındaki etkinliği. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2006; 20 (5): 337-340.
3. Thompson RCA. Biology and systematics of Echinococcus. Adv Parasitol 2017; 95: 65–109. ISSN 0065-308X.
4. Constantine CC, Lymbery AJ, Jenkins DJ, et al. Factors influencing the development and carbohydrate metabolism of Echinococcus granulosus in dogs. J Parasitol 1998; 84: 873- 881.
5. Thompson RCA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus. Trends Parasitol 2002; 18: 452-457.
6. Lymbery AJ, Thompson RCA. The molecular epidemiology of parasite infections: tools and applications. Mol Biochem Parasitol 2012; 181: 102-116.
7. Rausch RL. Echinococcus granulosus: biology and ecology. in: Anderson, F.L, Ouhelli, H, Kachani, M. (Eds.), Compendium of cystic echinococcosis in Africa and in middle eastern countries with special reference to Morocco. Brigham Young University, Provo, UT, 1997; 18-53.
8. Deplazes P, Rinaldi L, Rojas CA, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis. Adv Parasitol 2017; 95: 315–493.
9. Lichtenwalner A, Adhikari N, Kantar L, Jenkins E, Schurer J. Echinococcus granulosus genotype G8 in maine moose (Alces alces). Alces 2014; 50: 27-33.
10. Rausch RL. Cystic echinococcosis in the Arctic and Sub-Arctic. Parasitol 2003; 127: 73-85.
11. Schurer J, Shury T, Leighton F, Jenkins E. Surveillance for Echinococcus canadensis genotypes in Canadian ungulates. Int J Parasitol Parasites Wildl 2013; 2: 97-101.
12. Sweatman GK. Distribution and incidence of Echinococcus granulosus in man and other animals with special reference to Canada. Can J Public Health 1952; 43: 480-486.
13. Trezeguet MA, Torres P, Kistermann JC. Sistema de vigilancia epidemiologica de la Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis 487 hidatidosis animal, en establecimientos con bovinos, ovinos o porcinos, por medio de la faena en la republica Argentina. in: Alimentaria, S.N.d.S.y.C. (Ed.), Senasa 2011.
14. de la Rue ML. Cystic echinococcosis in southern Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2008; 50: 53-56.
15. Ibrahim MM. Study of cystic echinococcosis in slaughtered animals in Al Baha region, Saudi Arabia: interaction between some biotic and abiotic factors. Acta Trop 2010; 113: 26-33.

16. Ahmadi NA. Hydatidosis in camels (*Camelus dromedarius*) and their potential role in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Iran. *J Helminthol* 2005; 79: 119-125.
17. Ahmadi NA, Meshkekar M. An abattoir-based study on the prevalence and economic losses due to cystic echinococcosis in slaughtered herbivores in Ahwaz, south-western Iran. *J Helminthol* 2011; 85: 33-39.
18. Eslami A, Shayan P, Bokaei S. Morphological and genetic characteristics of the liver hydatid cyst of a donkey with Iran origin. *Iran J Parasitol* 2014; 9: 302-310.
19. Samavatian A, Valilou MR, Lotfi A, Khani MY, Mirzaei H. Study of the incidence rate of liver and lung hydatidosis in slaughtered cattle and buffaloes, at Ahar Abattoir (Arasbaran Region e Northwestern Iran) during 2007-2008. *Buffalo Bull* 2009; 28: 218-222.
20. Lahmar S, Boufana B, Jebabli L. et al. Modelling the transmission dynamics of cystic echinococcosis in donkeys of different ages from Tunisia. *Vet Parasitol* 2014; 205: 119-124.
21. Altıntaş N. Past to present: echinococcosis in Turkey. *Acta Trop* 2003; 85: 105-112.
22. Kurtpınar H. Erzurum, Kars ve Ağrı vilayetleri sığır, koyun ve keçilerinin yaz aylarına mahsus parazitleri ve bunların doğurdıkları hastalıklar. *Türk Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 1956; 27: 3320-3325.
23. Arslan MÖ, Umur Ş. Erzurum mezbahalarında kesilen koyun ve sığırlarda hidatidozun yayılış ve ekonomik önemi. *Kafkas Üni Vet Fak Derg* 1997; 3: 167-171.
24. Umur Ş, Aslantaş Ö. Kars belediye mezbahasında kesilen ruminantlarda hidatidozun yayılışı ve ekonomik önemi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1993; 17: 27-34.
25. Toparlak M, Gül Y. Van ili belediye mezbahasında kesilen hayvanlarda hidatidozun yayılışı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1989; 36: 129-137.
26. Değer S, Ayaz E, Gül A, Biçek K, Eraslan A. Van yöresinde kesilen sığır, koyun ve keçilerde hidatidozun yayılışı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2001; 7: 37-40.
27. Kesik HK. *Echinococcus granulosus*'un sığır ve koyun izolatlarındaki antijen b (agb) gen polimorfizminin belirlenmesi ve serolojik tanı üzerindeki etkinliğinin araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2018.
28. Şimşek S, Köroğlu E, Dumanlı N, Aktaş M. Seroprevalence of cattle hydatidosis in some districts in the East Anatolian region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29: 1305-1310.
29. Şimşek S, Köroğlu E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid diseases in sheep. *Acta Trop* 2004; 92: 17-24.
30. Umur S. Prevalence and economic importance of cystic echinococcosis in slaughtered ruminants in Burdur, Turkey. *J Vet Med* 2003; B50: 247-252.
31. Torgerson PR, Carmona C, Bonifacino R. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 703-713.
32. Torgerson PR. Economic effects of echinococcosis. *Acta Trop* 2003; 85: 113-118.

33. Budge MC, Jiamin Q, Qian W, Torgerson PR. Economic effects of echinococcosis in a disease-endemic region of the Tibetan Plateau. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(1): 2–10.
34. Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socio economic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Inf Dis* 2006; 12: 296–303.
35. Torgerson PR, Macpherson CN. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Vet Parasitol* 2011; 182 (1), 79-95.
36. Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 18-36.
37. Eckert J, Deplazes P, Craig PS, et al. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J, Gemmel MA, Meslin F-X, Pawlowski ZS, editors. WHO/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Paris; World Organisation for Animal Health 2001; 72-99
38. Lightowlers MW, Gottstein B. Antigens, Immunological and molecular diagnosis. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. Echinococcosis and hydatid diseases. CAB International Oxon 1995; 355-410.
39. Çırak VY. Hayvanlarda erişkin ve larver echinococcosisin tedavisi. *Hidatidoloji Derneği, Ege Üniversitesi Matbaası İzmir* 2004; 1:317-324.
40. Parada L, Cabrera P, Burges C, et al. Echinococcus granulosus infections of dogs in the Durazno region of Uruguay. *Vet Record* 1995; 136: 389-391.
41. Craig TM. Parasite of Sheep and Goats. In: Flynn's parasite of laboratory animals. Ed. Backer, DG. 2nd Edition. Blackwell Publishing. 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 2007; 642-691.
42. Torgerson PR, Budke CM. Echinococcosis an international public health challenge. *Res Vet Sci* 2003; 74: 191–202.
43. Gemmell M, Roberts M, Beard T, et al. Control of echinococcosis. In: Eckert J, Gemmell M, Meslin F-X, Pawlowski Z, eds. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Paris: Organisation for Animal Health 2001; 195–204.
44. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet* 2003; 362(9392): 1295-1304.
45. Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol* 1996; 18: 457–462.
46. Gauci C, Jenkins D, Lightowlers MW. Strategies for optimal expression of vaccine antigens from taeniid cestode parasites in Escherichia coli. *Mol Biotechnol* 2011; 48: 277–289.
47. Larriue E, Mujica G, Araya D, et al. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: 8 years of work. *Acta Trop* 2019; 191: 1–7.
48. Amarir F, Rhalem A, Sadak A, et al. Control of cystic echinococcosis in the Middle Atlas, Morocco: Field evaluation of the EG95 vaccine in sheep and cesticide treatment in dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 2021; 15: e0009253.

49. Romig T, Deplazes P, Jenkins D, et al. Ecology and life cycle patterns of *Echinococcus* species. *Adv Parasitol* 2017; 95: 213–314.
50. Lymbery AJ. Phylogenetic pattern, evolutionary processes and species delimitation in the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 2017; 95: 111–145.
51. Kinkar L, Laurimäe T, Sharbatkhori M, et al. New mitogenome and nuclear evidence on the phylogeny and taxonomy of the highly zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus* s.s. *Infect Gen Evol* 2017; 52: 52–58.
52. Lashkarizadeh MR, Hooshmand N, Nasibi S, et al. Genetic profile of hydatid cysts in patients with multi-organ involvement: Mixed infections by different strains. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2019; 19: 724–730.
53. Ali V, Martinez E, Duran P, et al. *Echinococcus granulosus* s.s, *Echinococcus ortleppi*, and *E. intermedius* (G7) are present in Bolivia. *Parasitology* 2020; 147:9 949-956.
54. Ahmed ME, Salim B, Grobusch M, Aradaib IE. First molecular characterization of *Echinococcus granulosus* (s.s.) genotype 1 among cattle in Sudan. *BMC Vet Res* 2018; 14: 36.
55. Terefe Y, Addy RNF, Alemu S, et al. Genetic characterization of *Echinococcus* species in eastern Ethiopia. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* 2019; 17:100302.
56. Lymbery AJ, Jenkins EJ, Schurer JM, Thompson RCA. *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends Parasitol* 2014; 31: 23–29.
57. Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 2006; 134: 713–722.
58. Addy RNF, Wassermann M, Banda F, et al. Genetic polymorphism and population structure of *Echinococcus ortleppi*. *Parasitology* 2016; 144: 450–458.
59. Schurer JM, Émilie B, Bryant A, et al. *Echinococcus* in wild canids in Québec (Canada) and Maine (USA). *PLoS Negl Trop Dis* 2018; 12: e0006712.
60. Li JQ, Li L, Fan YL, et al. Genetic diversity in *Echinococcus multilocularis* from the Plateau Vole and Plateau Pika in Jiuzhi County, Qinghai Province, China. *Front Microbiol* 2018; 9: 2632.
61. Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, et al. International consensus on terminology to be used in the field. *Parasite* 2020; 27, 41.
62. Laurimäe T, Kinkar L, Moks E, et al. Molecular phylogeny based on six nuclear genes suggests that *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes G6/G7 and G8/G10 can be regarded as two distinct species. *Parasitology* 2018; 145: 1929–1937.
63. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E, Mc Manus DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. *Acta Trop* 2008; 107: 192-194.
64. Şimşek S, Eröksüz Y. Occurrence and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in Turkish mouflon (*Ovis gmelinii anatolica*). *Acta Trop* 2009; 109: 167-169.

65. Snabel V, Altintas N, D'Amelio S, et al. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol Res* 2009; 105: 145-154.
66. Vural G, Baca AU, Gauci CG, et al. Variability in the *Echinococcus granulosus* Cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol* 2008; 154: 347-350.
67. Arikoglu H, Arslan A, Hepdogru MA, Turhan AB. Expression profile and polymorphisms of actin genes in protoscoleces of *Echinococcus granulosus* from sheep in central Turkey. *Vet Parasitol* 2009; 166: 80-85.
68. Ütük AE, Şimşek S. Molecular characterization of the horse isolate of *Echinococcus granulosus* in Turkey. *J Helminthol* 2013; 87, 305-308.
69. Ütük AE, Pişkin FC, Dalkılıç B. Molecular characterization of sheep isolates of *Echinococcus granulosus* in Kilis Province. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2012; 18: 35-38.
70. Yıldırım FA, Yıldız K, Çakır Ş, Gazyağcı AN. Kırıkkale bölgesinde koyun kökenli *Echinococcus granulosus* izolatlarının moleküler karakteri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2010; 16 (2) : 245-250.
71. Beyhan YE, Umur Ş. Molecular Characterization and prevalence of cystic echinococcosis in slaughtered water buffaloes in Turkey. *Vet Parasitol* 2011; 181: 174-179.
72. Şimşek S, Çevik A. First detection and molecular characterization of *Echinococcus equinus* in a mule in Turkey. *Acta Parasitol* 2014; 59: 773-777.
73. Şimşek S, Kaplan M, Özercan IH. Comprehensive molecular survey of *Echinococcus granulosus* in formaline fixed paraffin embedded tissues in human isolates in Turkey. *Vet Parasitol* 2011; 109: 411-416.
74. Ergin S, Saribas S, Yuksel P, et al. Genotypic characterisation of *Echinococcus granulosus* isolated from human in Turkey. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4: 551-555.
75. Şimşek S, Balkaya İ, Köröglü E. Epidemiological survey and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in cattle in an endemic area Eastern Turkey. *Vet Parasitol* 2009; 172: 347-349.
76. Şimşek S, Balkaya İ, Çiftçi AT, Ütük AE. Molecular discrimination of sheep and cattle isolates of *Echinococcus granulosus* by SSCP and conventional PCR in Turkey. *Vet Parasitol* 2011; 178: 367-369.
77. Ütük AE, Pişkin FÇ. Melez bir dağ keçisinde hydatidosis ve moleküler karakterizasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2010; 16: 671-673.
78. Gökpinar S, Değirmenci R, Yıldız K. Kırıkkale'de kesilen sığırlarda *Echinococcus granulosus*'un moleküler olarak genotiplendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2017; 64: 51-54.
79. Eryıldız C, Sakru N. Molecular characterization of human and animal isolates of *Echinococcus granulosus* in the Thrace Region, Turkey. *Balkan Med J* 2012; 29: 261-267.

80. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Boil* 2013; 14: 475–488.
81. Kinkar L, Laurimäe T, Balkaya I, et al. Genetic diversity and phylogeography of the elusive, but epidemiologically important *Echinococcus granulosus* s.s. genotype G3. *Parasitology* 2018; 1–10.
82. Kinkar L, Laurimäe T, Simsek S. High-resolution phylogeography of zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus* s.s. genotype G1 with an emphasis on its distribution in Turkey, Italy and Spain. *Parasitology* 2016; 1790.
83. Özyalın Ö. Kist hidatikli vakalardan elde edilen izolatlarda *Echinococcus granulosus*'un moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, Tıp fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2019.
84. Kesik HK, Celik F, Simsek S, et al. Molecular characterization and haplotype analyses of lung hydatid cyst isolates of cattle and first report of *Echinococcus canadensis* (G6/ G7) in cattle isolates in Turkey. *Acta Parasitol* 2021; 66: 1538.
85. Mehmood S, Simsek S, Celik F, et al. Molecular survey on cattle and sheep hydatidosis and first detection of *Echinococcus canadensis* (G6/G7) in sheep in Turkey. *Parasitology* 2020; 147:9. 1055 – 1062.
86. Kesik HK, Celik F, Kilinc SG, et al. Genetic diversity and haplotype analysis of cattle hydatid cyst isolates using mitochondrial markers in Turkey. *Pathogens* 2022; 11:519.
87. Bakal U, Celik F, Simsek S, Kesik HK, Kilinc SG. Genetic diversity and haplotypes of paediatric hydatid cyst isolates and first occurrence of *E. canadensis* (G6/G7) in paediatric cases in Turkey. *Parasitology* 2021; 1–8.
88. Kedra AH, Swiderski Z, Tkach V, et al. Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitol* 1999; 44: 248–254.
89. Thompson RCA. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol* 2008; 119: 439–446.
90. Schneider R, Gollackner B, Schindl M, Tucek G, Auer H. *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82, 871–874.
91. Brehm K, Spiliotis M, Zavala-Góngora R, Konrad C, Frosch M. The molecular mechanisms of larval cestode development: first steps into an unknown world. *Parasitol Int* 2006; 55: 15–21.
92. Mariconti M, Vola A, Manciuilli T, et al. Role of microRNAs in host defense against *Echinococcus granulosus* infection: a preliminary assessment. *Immun Res* 2018; 67, 93–97.
93. Cucher M, Prada L, Mourglia-Ettlin G, et al. Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int J Parasitol* 2011; 41: 3–4,439-448.

94. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 2013; 496: 57–63.
95. Zheng H, Zhang W, Zhang L, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet* 2013; 45, 1168–1175.
96. Lekka E, Hall J. Noncoding RNAs in disease. *FEBS Letters* 2018; 592: 2884–2900.
97. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 2018; 173: 1, 20-51.
98. Barbagallo D, Vittone G, Romani M, Purrello M. Noncoding RNAs in health and disease. *Int J Genom* 2018; ID:9135073: 1-2.
99. He Z, Yan T, Yuan Y, Yang D, Yang G. miRNAs and lncRNAs in *Echinococcus* and echinococcosis. *Int Journal of Mol Sci* 2020; 21: 730.
100. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2009; 10: 126–139.
101. O’Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 295-312.
102. Hao S, Baltimore D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Natu Immunol* 2009; 10: 81–288.
103. Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *COPHAR* 2009; 4: 514-520.
104. Gantier MP. New perspectives in MicroRNA regulation of innate immunity. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30: 5.
105. Thompson RCA, Lymbery AJ, Constantine CC. Variation in *Echinococcus* towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 1995; 35: 145-76.
106. Marchiondo AA, Andersen FL. Fine structure and freeze-etch study of protoscolex tegument of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda). *The Journal of Parasitology* 1983; 69(4): 709-718.
107. Cai P, Gobert GN, McManus DP. MicroRNAs in parasitic helminthiases: current status and future perspectives. *Trends Parasitol* 2016; 1427 (32): 71–86.
108. Silakit R, Loilome W, Yongvanit P, et al. Circulating miR-192 in liver fluke-associated cholangiocarcinoma patients: a prospective prognostic indicator. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014; 21: 864–872.
109. Cucher M, Macchiaroli N, Kamenetzky L, et al. High-throughput characterization of *Echinococcus* spp. metacestode miRNomes. *Int J Parasitol* 2015; 45(4): 253-267.
110. Macchiaroli N, Cucher M, Zarowiecki M, et al. microRNA profiling in the zoonotic parasite *Echinococcus canadensis* using a high-throughput approach. *Parasit Vectors* 2015; 8: 83.
111. Bian EB, Xiong ZG, Li J. New advances of lncRNAs in liver fibrosis, with specific focus on lncRNA–miRNA interactions. *J Cell Physiol* 2018; 234: 2194–2203.
112. Zhang Z, Yang T, Xiao J. Circular RNAs: Promising biomarkers for human diseases. *EBioMedicine* 2018; 34: 267–274.
113. Macchiaroli N, Maldonado LL, Zarowiecki M, et al. Genome-wide identification of microRNA targets in the neglected disease pathogens of the genus *Echinococcus*. *Mol Biochem Parasitol* 2017; 214: 91-100.

114. Zheng Y. Suppression of mouse miRNA-222-3p in response to *Echinococcus multilocularis* infection. *Int Immunopharmacol* 2018; 64: 252–255.
115. Judice CC, Bourgard C, Kayano ACAV, Albrecht L, Costa FTM. MicroRNAs in the host-apicomplexan parasites interactions: a review of immunopathological aspects. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6:5.
116. Carrière J, Barnich N, Nguyen HTT. Exosomes: from functions in host-pathogen interactions and immunity to diagnostic and therapeutic opportunities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2016; 172: 39–75.
117. Du WW, Zhang C, Yang W, et al. Identifying and characterizing circRNA-protein interaction. *Theranostics* 2017; 7: 4183–4191.
118. Kwak PB, Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Boil* 2012; 19: 145–151.
119. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 2010; 465: 584–589.
120. Bai Y, Zhang Z, Jin L, et al. Genome-wide sequencing of small RNAs reveals a tissue-specific loss of conserved microRNA families in *Echinococcus granulosus*. *Genom* 2014; 15: 736.
121. Mortezaei S, Afgar A, Mohammadi MA, et al. The effect of albendazole sulfoxide on the expression of miR-61 and let-7 in different in vitro developmental stages of *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop* 2019; 195: 97–102.
122. Yu A, Wang Y, Yin J, et al. Microarray analysis of long non-coding RNA expression profiles in monocytic myeloid-derived suppressor cells in *Echinococcus granulosus*-infected mice. *Parasit Vectors* 2018; 11: 327.
123. Guo X, Zhang X, Yang J, et al. Suppression of nemo-like kinase by miR-71 in *Echinococcus multilocularis*. *Exp Parasitol* 2017; 183: 1–5.
124. Guo X, Zheng Y. MicroRNA expression profile in RAW264·7 macrophage cells exposed to *Echinococcus multilocularis* metacystodes. *Parasitology* 2018; 145(3): 416–423.
125. Jiang S, Li X, Wang X, et al. MicroRNA profiling of the intestinal tissue of Kazakh sheep after experimental *Echinococcus granulosus* infection, using a high-throughput approach. *Parasite* 2016; 23: 23.
126. Torgerson PR. The use of mathematical models to simulate control options for echinococcosis. *Acta Trop* 2003; 85: 211–221.
127. Eroglu F, Dokur M, Ulu Y. MicroRNA profile in immune response of alveolar and cystic echinococcosis patients. *Parasite Immunol* 2021; 43 (7): e12817.
128. Macchiaroli N, Preza M, Perez MG, et al. Expression profiling of *Echinococcus multilocularis* miRNAs throughout metacystode development in vitro. *PLoS Negl Trop Dis* 2021; 15(3): e0009297.

129. Orsten S, Baysal İ, Yabanoglu-Ciftci S, et al. MicroRNA expression profile in patients with cystic echinococcosis and identification of possible cellular pathways. *J Helminthol* 2021; 95(1): 1–5.
130. Mahami-Oskouei M, Norouzi B, Ahmadpour E, et al. Expression analysis of circulating miR-146a and miR-155 as novel biomarkers related to effective immune responses in human cystic echinococcosis. *Microb Pathog* 2021; 157: 104962.
131. Juvvuna PK, Khandelia P, Lee LM, Makeyev EV. Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 6808–6820.
132. Nakao M, Sako Y, Yokoyama N, Fukunaga M, Ito A. Mitochondrial genetic code in cestodes. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 111: 415–424.
133. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018; 35: 1547–1549.
134. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol* 2017; 34: 3299–3302.
135. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 1989; 123: 585–595.
136. Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1997; 147: 915–925.
137. Fu YX, Li WH. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 1993; 133: 693–709.
138. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 1999; 16: 37–48.
139. Rio DC, Jr MA, Hannon GJ, Timothy WN. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harbor Laboratory Press 2010; 6.
140. Kramer MF. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol* 2011; 15: 15.10.
141. Sun J, Wang S, Li C, Ren Y, Wang J. Novel expression profiles of microRNAs suggest that specific miRNAs regulate gene expression for the sexual maturation of female *Schistosoma japonicum* after pairing. *Parasite Vector* 2014; 7:177.
142. Ali R, Khan S, Khan M, et al. A systematic review of medicinal plants used against *Echinococcus granulosus*. *Plos One* 2020; 15(10): e0240456.
143. Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM, et al. High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2005; 131: 805- 815.
144. Altintas N, Oztatlici M, Altintas N, Unver A, Sakarya A. Molecular analysis of cattle isolates of *Echinococcus granulosus* in Manisa province of Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013; 19: 455-459.
145. Yan B, Liu X, Wu J, et al. Genetic diversity of *Echinococcus granulosus* genotype G1 in Xinjiang, northwest of China. *Korean J Parasitol* 2018; 56(4): 391-396.

146. Mehmood N, Dessi G, Ahmed F, et al. Genetic diversity and transmission patterns of *Echinococcus granulosus* s.s. among domestic ungulates of Sardinia, Italy. *Parasitol Res* 2021; 120: 2533–2542.
147. Ong SJ, Hsu HM, Liu HW, Chu CH, Tai JH. Multifarious transcriptional regulation of adhesion protein gene ap65-1 by a novel Myb1 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 2006; 5: 391-9.
148. Alizadeh Z, Mahami-Oskouei M, Spotin A, et al. Parasite-derived microRNAs in plasma as novel promising biomarkers for the early detection of hydatid cyst infection and post-surgery follow-up. *Acta Trop* 2020; 202: 105255.
149. Mortezaei S, Aftar A, Sadeghi B, et al. Comparative analysis of miRNA expressions in different developmental stages of *Echinococcus granulosus* in mono-phasic and di-phasic culture systems. *Infect Disord - Drug Targets* 2021; 21(5): 72-80(9).
150. Akıl M. Kistik ekinokokkozisli hastalarda dolaşımdaki mirna (let-7, mir-71 ve mir-10) 'ların kist evrelerine göre araştırılması. Doktora Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2020.
151. Örsten S, Baysal İ, Yabanoglu-Ciftci S, et al. Can parasite-derived microRNAs differentiate active and inactive cystic echinococcosis patients? *Parasitol Res* 2022; 121:191–196.

8. EKLER

ULUSLARARASI DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. **İREHAN B.**, KÖROĞLU E., ŞİMŞEK S. “Administration of Echinococcus granulosus protoscoleces by different ways in mice and detection of serological responses.” (Yüksek Lisans Tezi) Yayın Yeri: “Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi - 63, 245-249, 2016.
2. KILIÇ A., KALENDER H., KOÇ O., KILINÇ Ü., **İREHAN B.** and BERRİ M. “Molecular investigation of Coxiella burnetii infections in aborted sheep in eastern Turkey.” Yayın Yeri: Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University - IJVR, 2016, Vol.17, No:1, Ser. No. 54, Pages 41-44, 2016.
3. OZKARACA M., **İREHAN B.**, PARMAKSIZ A., EKİNCİ A., COMAKLI S. “Determination of Neospora caninum and Toxoplasma gondii in aborted fetuses by duplex PCR, immunohistochemistry and immunofluorescence methods.” Yayın Yeri: Medycyna Weterynaryjna - 73(6), 346-351, DOI:10.21521/mw.5707, 2017.
4. TURAN T., İŞİDAN H., **İREHAN B.**, ATASOY M.O. “Doğu Anadolu Bölgesi’nde Bazı Memeli Türlerinde Batı Nil Virüs Enfeksiyonunun Seroepidemiolojik Olarak İncelenmesi.” “Seroepidemiological Study of West Nile Virus Infections in Some of Mammalian Species from the Eastern Turkey.” Yayın Yeri: Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences 2017, 7 (1), 57-63, 2017.
5. TURAN T., İŞİDAN H., ATASOY M.O., **İREHAN B.** “Detection and molecular analysis of bovine enteric norovirus and nebovirus in Turkey.” Yayın Yeri: Journal of Veterinary Research - 62, 129-135, 2018. DOI:10.2478/Journal of Veterinary Research-2018-0021.
6. İŞİDAN H., TURAN T., ATASOY M.O., SÖZDUTMAZ İ., **İREHAN B.** “Detection and First Molecular Characterisation of Three Picornaviruses from Diarrhoeic Calves in Turkey.” Yayın Yeri: Acta Veterinaria Hungarica - 67 (3), pp.463-476 (2019).
7. GÜR S., **İREHAN B.**, GÜRÇAY M., TURAN T. “Serological investigation of equine viral arteritis in donkeys in eastern and south-eastern Anatolia regions of Turkey.” Yayın Yeri: Acta Veterinaria Brno Journal of the University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic - 2019, 88: 385-391.
8. **İREHAN B.**, SONMEZ A., ATALAY M.M., EKİNCİ A.I., CELİK F., DURMUS N., CİFTÇİ A.T., SIMSEK S. “Investigation of Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Tritrichomonas foetus in abortions of cattle, sheep and goats in Turkey: Analysis by real-time PCR, conventional PCR and histopathological methods” Yayın Yeri: Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases Volume 89, October 2022, 101867.

ULUSAL DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. GÜRÇAY M., TURAN T., ÖZKARACA M., **İREHAN B.** “Türkiye’nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde Hayvan Kuduzunun Epidemiyolojisi.” Yayın Yeri: Fırat Üniversitesi Sağ. Bil. Vet. Derg. 2010: 25(2): 61-66, 2010.
2. GÜR S., GÜRÇAY M., **İREHAN B.**, TURAN T. “Serological Investigation of Equine Viral Arteritis Infection in Donkeys and Horses in the Eastern Anatolia Region.” Yayın Yeri: Harran Üniv. Vet. Fak. Derg. 2018:7 (2): 186-191, 2018.
3. ÖZKARACA M., **İREHAN B.**, PARMAKSIZ A., EKİNCİ A., ÇOMAKLI S. “Determination of Neospora caninum and Toxoplasma gondii in sheep and goat fetuses using duplex PCR, immunohistochemistry, and immunofluorescence methods.” “Koyun ve Keçi Abortlarında Neospora caninum ve Toxoplasma gondii’ nin Dupleks PCR, İmmunohistokimyasal ve İmmunofloresans Yöntemlerle Teşhisi.” Yayın Yeri: Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 11(2) 200-206, 2016.

9. ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2001 yılında bitirdim. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Programı Parazitoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra yine aynı bölümde doktora eğitimime başladım. Elazığ Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde Veteriner Hekim olarak görev yapmaktayım.

