



Koyun ve Sığır Orijinli Hidatid Kistlerin SDS-PAGE ve HPTLC ile Protein ve Lipid Profillerinin Analizi

İbrahim BALKAYA¹, Özgür KAYNAR², Hamza AVCIOĞLU¹

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, ERZURUM
2. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ERZURUM

ÖZET: Koyun ve sığır karaciğer ve akciğerlerinden alınan kistlere ait kist sıvısı, germinal membran, kız kesesi ve protoskoleksler homojenize edildikten sonra, protein ve lipid profillerini belirlemek için SDS-PAGE ve HPTLC analizleri gerçekleştirildi. HPTLC analizi sonucunda, membran yapılarında, genel olarak tüm membranların oluşumuna katılan başlıca üç lipid sınıfı (fosfolipid, serbest yağ asidi, kolesterol) görülürken, sıvılarda ise sadece fosfolipidlerin varlığı tespit edildi. Numunelerin SDS-PAGE analizi sonucunda ise, moleküler büyüklükleri 8-205 kDa arasında, sığırlara ait karaciğer germinal membranında 16, akciğer germinal membranında 19, akciğer kız kese germinal membranında 15, akciğer kız kesesi sıvısında 17, akciğer steril kist sıvısında 4 adet, koyunlara ait akciğer germinal membranında 19, akciğer steril kist sıvısında 5 ve koyun akciğer fertil kist sıvısında 12 adet protein tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Echinococcus granulosus, HPTLC, Kist hidatik, Koyun, SDS-PAGE, Sığır.

Analysis of Protein and Lipid Profiles of Hydatid Cysts from Sheep and Cattle by SDS-PAGE and HPTLC

ABSTRACT: In sheep and cattle, the hydatid cyst fluids, cyst germinal membranes, cyst in the daughter sacs and microscopically identified protoscolexes taken from the livers and lungs, were analysed, following homogenisation according to the routine procedures, for illustrating the profiles of protein and lipid bands by using SDS-PAGE and HPTLC methods. According to the results of the HPTLC analyses, in the membrane structures, all three lipid classes (Phospholipid, Free Fatty Acids, Cholesterol), as contributing to the formation of all the membranes in general, were observed mainly, while presence of the phospholipid only was detected in the liquids. Following the SDS-PAGE analyses, various numbers of antigens, ranging from the 8 to 205 kDa molecular sizes, were detected, as; in bovine, germinal membrane of liver 16, in the germinal membrane of lung 19, in the daughter sac germinal membrane of lung 15, in the daughter sac fluid of lung 17, in the sterile cyst fluid of lung 4, while in ovine, in the germinal membrane of lung 19, in the sterile cyst fluid of lung 5 and, finally in the fertile cyst fluid of lung 12 antigens.

Key words: Cattle, Echinococcus granulosus, HPTLC, Hydatid cyst, SDS-PAGE, Sheep.

✍ Sorumlu yazar / Corresponding author;

☎ 0442 2315532,

✉ balkayaibrahim@hotmail.com

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi BAP Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (2009/139).

GİRİŞ

Hidatidosis, hem insan hem de evcil hayvanları etkileyen dünyadaki en önemli zoonozlardan birisi olup, özellikle az gelişmiş ülkelerdeki kırsal populasyonlarda oldukça sık görülmektedir. Türkiye'de de yaygın olarak görülen bu hastalık insanlarda ve hayvanlarda sağlık ve ekonomik yönden sorunlar oluşturmaya devam etmektedir (Güralp, 1981; Barış ve ark., 1989; Dar ve Alkarmi, 1997).

Echinococcus granulosus'un olgunları çeşitli karnivorların ince bağırsaklarında, larvası olan kist hidatik ise insanların da içinde bulunduğu birçok evcil ve yabani memelinin başta karaciğer ve akciğer olmak üzere hemen hemen bütün organ ve dokularında bulunabilmektedir (Güralp, 1981; Morris ve Richards, 1992).

Son yıllarda immunodiagnoz alanına hızla giren sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ve Western blot yöntemleri, enfeksiyon etkenlerinin protein yapısındaki spesifik antijenlerini ortaya çıkararak, indirekt tanı yöntemlerinin değerini düşürmüş ve çapraz reaksiyon gibi olumsuzlukları ortadan kaldırmıştır (Sharma ve ark., 1987).

Poliakrilamid jellerde çok yaygın olarak kullanılan çözücü ajan sodyum dodesil sülfat (SDS)'tir. Protein karışımı, SDS ve 2-merkaptotanol varlığında ısıtıldığında proteinlerin disülfid bağları kırılarak denatüre edilir. Bu şartlar altında, birçok polipeptid ağırlığına göre SDS'i bağlamakta, bunun sonucunda SDS-polipeptid komplekslerinin yük dansiteleri aynı olmakta ve polipeptid boyutuna göre poliakrilamid jelde göç etmektedirler (Reiner, 2005).

Kromatografi tekniği, temelde denge dağılım katsayılarının farklılıkları sebebiyle, çözünürlükleri birbirinden farklı olan bileşiklerin iki farklı faz arasında ayrılmasını gerektirir. Bu fazlardan birincisi sabit faz diğeri ise mobil fazdır. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC), özellikle lipidlerin analizinde

kullanılan kullanışlı, hızlı, güvenilir ve ucuz bir kromatografi türüdür (Elke, 2007).

SDS-PAGE de proteinlerin fraksiyonunda aynı antijenle çalışılmasına rağmen farklı sonuçların alındığı rapor edilmiştir. Bu farklılıkların antijenin ekstraksiyonunda kullanılan metotların farklı olmasından, ayrıca çalışmanın çeşitli aşamalarında kullanılan aletlerden ve özellikle protein kesici ve jel polimerizasyonunda kullanılan kimyasal maddelerin kalite ve kantite değişikliklerinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Köksal ve ark., 1995).

Kanwar ve ark. (1992), koyun, keçi, domuz ve insandan aldıkları hidatik kist sıvılarında molekül ağırlıkları 8-116 kDa arasında değişen en az 15 protein fraksiyonu saptadıklarını kaydetmişlerdir.

Burgu ve ark. (2000), SDS-PAGE ve Western blot yöntemleriyle kist hidatik için koyunlarda spesifik proteinin 116 kDa, insanlar için de 68 ve 8 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Köksal ve ark. (1995), insan, koyun ve sığır kökenli hidatik kist sıvılarındaki proteinlerin SDS-PAGE ile analizlerinde 8-120 kDa arasında değişen 20 kadar bant bulmuşlardır.

Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada (Şaşmaz ve ark., 1995), kist hidatiğin protoskoleks, kist sıvısı ve çimlenme kapsülü kullanılarak, bunlara ilişkin antijenik profilleri Western blot ile ortaya konmuş ve 8,20,45,57,68 kDa'luk antijenik determinantların, cerrahi olarak doğrulanmış hasta kan serumları kullanılarak teyit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca sığır ve koyun kökenli kist sıvılarından da benzer sonuçlar alındığı kaydedilmiştir.

Bu çalışmada SDS-PAGE ve HPTLC kombinasyonu kullanılarak, hidatik kistlerin protoskoleks, germinal membran, kist sıvıları ve kız keselerindeki sırasıyla protein ve lipid profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışma materyali için Erzurum'da bulunan Özbeyli Et Kombinasında kesimi yapılan sığırların ve koyunların karaciğerleri ve akciğerleri *Echinococcus granulosus*'un larvası olan kist hidatik yönünden kontrol edilmiş ve kist bulunan dokular herhangi bir işlem yapılmadan direk laboratuara getirilerek incelemeye alınmıştır. Elde edilen kistlere ait; kist sıvıları, germinal membranları, kistler içerisinde görülen kız keselerine ait kist sıvıları ve bu kız keselerin germinal membranları ve protoskoleksleri homojenize edilmiştir.

Kist sıvısı antijenlerinin hazırlanması

Koyun ve sığır karaciğerlerinden elde edilen hem fertil hem de steril hidatik kist sıvıları +4°C'de, 3500 x g'de 15 dakika süreyle santrifüj edilerek protoskoleks ve diğer partiküllerin çökmesi sağlandı. Sonuçta elde edilen süpernatantlar 2 ml kapasiteli eppendorf tüplere porsiyonlanarak SDS-PAGE ve HPTLC analizleri yapıncaya kadar -86°C'de saklandı.

Protoskoleks, germinal membran ve kız kese membran antijenlerinin hazırlanması

Koyun ve sığır karaciğerlerinden elde edilen fertil kist sıvıları, akciğer ve karaciğerden elde edilen germinal membranlar ve sığır akciğerinden elde edilen kız keseler 3500 x g'de 15 dakika süreyle santrifüj edilerek çökmesi sağlandı. Süpernatant uzaklaştırılarak prespitant üzerine 10 ml Tris HCl (pH 6,8) tamponu ilave edildi ve +4 °C'de, 3500 x g'de 15 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem 4 kez daha tekrar edildi.

Sonuçta elde edilen kist sıvıları, protoskoleksler, germinal membranlar ve kız keseler potter-elvehjem homojenizatöre alındı ve 1/5 oranında %10 SDS, %1 Tween 20 karışımıyla buz içerisinde cam homojenizatör ile 10 dk süreyle homojenize edildi. Bu homojenat 2 ml kapasiteli eppendorf tüplere porsiyonlanarak SDS-PAGE ve HPTLC analizleri yapıncaya kadar -86 °C'de saklandı.

Numunelerin SDS-PAGE analizi

Eppendorf tüpe alınan 5 µl serum üzerine 245 µl elektroforez sample buffer'ı eklendi. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra %10 konsantre jelde 20 mA/jel sabit akım modunda yaklaşık 2 saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Numunelerin HPTLC analizi

Bir ml serum üzerine 2 ml, içerisinde %1 Butylatedhydroxytoluene içeren ekstraksiyon solüsyonundan eklenerek 2 dk süreyle serum-solvent karışımı vorteksledi. Daha sonra numuneler 5000 x g de +4 °C' de 10 dk süreyle santrifüj edildi ve üstteki hekzan fazı, 5 µl hacimde, yıkanmış HPTLC plakalarına uygulandı. Plakalar developing solüsyonunda en az 5 cm yürütüldü ve süre sonunda boyanarak analizleri gerçekleştirildi.

BULGULAR

Lipid profil analizi

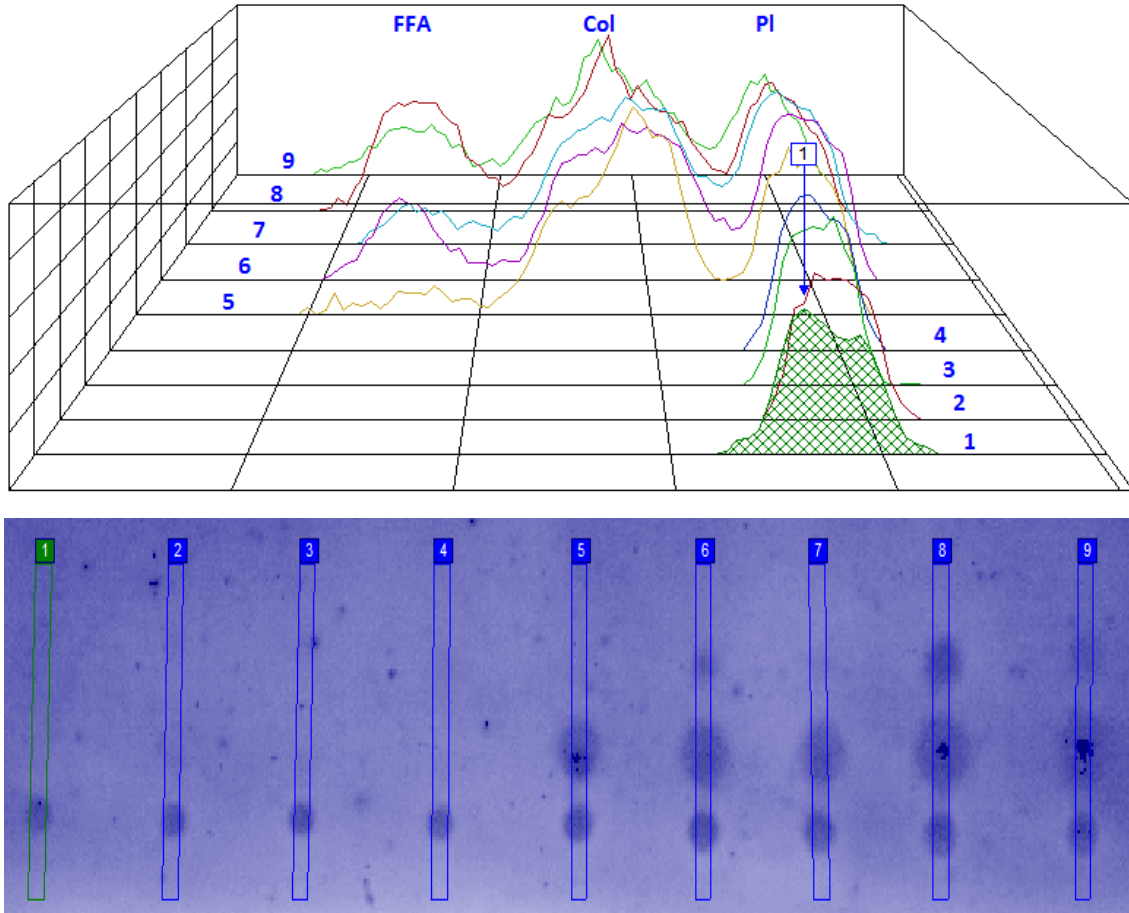
Numunelerin HPTLC analizi sonucunda, membran yapılarında, genel olarak tüm membranların oluşumuna katılan başlıca üç lipid sınıfı (fosfolipid, serbest yağ asidi, kolesterol) görülürken sıvılarda ise sadece fosfolipid varlığı tespit edildi.

Protein profil analizi

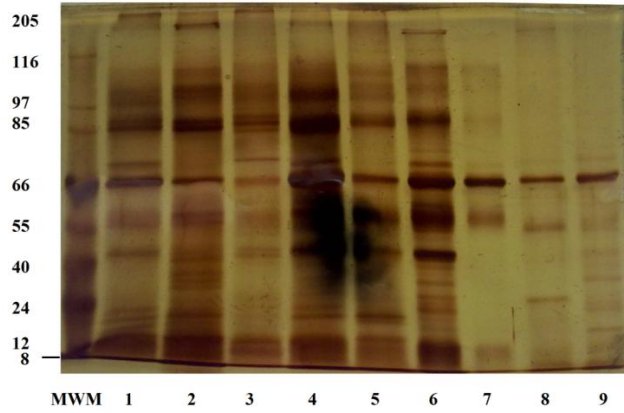
Numunelerin SDS-PAGE analizi sonucunda, 8-205 kDa moleküler büyüklüğü arasında, sığırlara ait karaciğer germinal membranında 16, akciğer germinal membranında 19, akciğer kız kese germinal membranında 15, akciğer protoskoleksinde 14, akciğer kız kesesi sıvısında 17, akciğer steril kist sıvısında 4 adet, koyunlara ait akciğer germinal membranında 19, akciğer steril kist sıvısında 5 ve akciğer fertil kist sıvısında 12 adet antijen tespit edildi (Şekil 2).

Tablo 1. Germinal membran, protoskoleks ve kist sıvılarının lipid profilleri**Table 1.** Germinal membrane, protoscolex and cyst fluids of lipid profiles

	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8	Lane 9
	Band %	Band %	Band %	Band %	Band %	Band %	Band %	Band %	Band %
PI	100	100	100	100	6,13	14,41	6,63	27,47	17,64
Col					59,10	50,35	54,44	48,71	56,12
FFA					34,76	35,24	38,92	23,82	26,25

**Şekil 1.** Germinal membran, protoskoleks ve kist sıvılarının HPTL kromatogramı (FFA: Serbest yağ asidi, Col: Kolesterol, PI: Fosfolipid).**Figure 1.** Germinal membrane, protoscolex and cyst fluids of HPTL chromatogram (FFA: Free Fatty Acids, Col: Cholesterol, PI: Phospholipid).

1. Koyun akciğer fertil kist sıvısı, 2. Koyun akciğer steril kist sıvısı, 3. Sığır akciğer steril kist sıvısı, 4. Sığır akciğer kız kese sıvısı, 5. Sığır akciğer protoskoleksi, 6. Koyun akciğer germinal membranı, 7. Sığır akciğer kız kese germinal membranı, 8. Sığır akciğer germinal membranı, 9. Sığır karaciğer germinal membranı



Şekil 2. Numunelerin SDS-PAGE elektroforetogramı

Figure 2. Samples of SDS-PAGE electroforetogram

1. Sığır karaciğer germinal membranı, 2. Sığır akciğer germinal membranı, 3. Sığır akciğer kız kese germinal membranı, 4. Koyun akciğer germinal membranı, 5. Sığır akciğer protoskoleksi, 6. Sığır akciğer kız kese sıvısı, 7. Sığır akciğer steril kist sıvısı, 8. Koyun akciğer steril kist sıvısı, 9. Koyun akciğer fertil kist sıvısı

TARTIŞMA

Echinococcosis, dünyadaki önemli zoonotik enfeksiyonlardan birisi olup, özellikle az gelişmiş ülkelerde, insan ve hayvanlarda sıkça rastlanmaktadır (Rickard ve ark., 1986). Klinik bulguların yeterince belirgin olmayışı nedeniyle ara konaklardaki teşhisinde problemler ortaya çıkmaktadır. Hastalığın erken tanısı şüphesiz tedavideki başarı şansını da artırmaktadır (Hira ve ark., 1990).

Echinococcus granulosus'un farklı gelişme dönemlerinin değişik antijenik özellik gösterdiği ve hidatidozda antijenlerin kaynağının ise genelde kist sıvısı, kist membranı ve protoskoleksler olduğu bilinmektedir. Hidatidosisli farklı konaklardan elde edilen kist sıvılarının antijen konsantrasyonları karşılaştırıldığında, insan ve koyun kistlerinin, sığır ve domuz kistlerine oranla, karaciğer kistlerinin ise akciğer kistlerine oranla daha fazla antijenik yapıya sahip olduğu saptanmıştır (Musiani ve ark., 1978). Yapılan bu çalışmada akciğerden alınan kistlere ait germinal membranlarda sığır ve koyun arasında

belirgin bir farklılık görülmemiş ancak akciğerden alınan kist sıvıları karşılaştırıldığında koyuna ait olanın sığıra göre 1 bant daha fazla olduğu tespit edilmiş olup bu durumun verilen literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

Klasik elektroforetik yöntemler içerisinde modifiye edilmiş jel sistemleri olmasına rağmen SDS-PAGE bunların içerisinde en iyi bilinenlerden birisidir. Yöntemin önemli özelliklerinden birisi çok sayıda protein karışımlarının analizine imkan sağlamasıdır (Bulut ve ark., 2001).

Burgu ve ark. (2000), koyun hidatik kist sıvısının SDS-PAGE ile analizinde moleküler ağırlığı 8 ile 200 kDa arasında değişen dokuz farklı spesifik protein bandı elde etmişlerdir. Şimşek ve Köroğlu (2004) ise aynı yöntemle koyun kist sıvısında 29, 45, 58, 68, 98 ve 116 kDa moleküler ağırlığında altı farklı polipeptid bandı tespit etmişlerdir. Şimşek ve ark. (2006), koyundaki kistler üzerinde yaptıkları diğer bir çalışmada, ham kist sıvısı antijeninin separasyonu sonucu 8 ile 205 kDa aralığında 15 farklı protein bandı elde etmişler ve 66 kDa'luk bantın en belirgin bant olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Kanwar ve ark. (1992), koyun hidatik kist sıvısında SDS-PAGE yöntemiyle moleküler ağırlığı 8-116 kDa arasında değişen 15 farklı fraksiyon belirlemişler ve bunlar içerisinde en belirgin olanının 66 kDa'luk band olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da numunelerin SDS-PAGE ile analizi sonucunda, 8-205 kDa molekül büyüklüğü arasında 19 farklı protein bandı tespit edilmiş ve kistlerden elde edilen protein bantlarına bakıldığı zaman 66 kDa'un parazitin bütün gelişim safhalarında mevcut olduğu görülmüştür.

Germinal membran, protoskoleks ve kist sıvılarının lipid profili analizleri sonucunda, kist sıvılarında lipid olarak sadece fosfolipid bulunduğu görüldü. Ayrıca sığır akciğer protoskoleks membranı ile sığır akciğer kız kese membranınin lipid profilinin çok benzer olduğu, bu örneklerdeki lipid sınıflarının oranları sığır akciğer protoskoleks membranında

fosfolipid %6.13, kolesterol %59.1 ve serbest yağ asidi %34.76 iken sığır akciğer kız kese membranında aynı sırayla %6.63, %54.44 ve %38.92 olarak tespit edildi. Bunlara ek olarak diğer membranların lipid profillerinin birbirlerinden farklı olduğu ve koyun akciğer germinal membranında fosfolipid %14.41, kolesterol %50.35 ve serbest yağ asidi %35.24, sığır akciğer germinal membranında aynı sırayla %27.47, %48.71 ve %23.83, sığır karaciğer germinal membranında ise fosfolipid %17.64, kolesterol %56.12 ve serbest yağ asidi %26.25 olduğu tespit edildi (Tablo 1). Daha önceki çalışmalarda hem germinal membran hem de kist sıvılarının kromatografik lipid analizlerine ait bir bulgu olmadığı için lipid sonuçlarının karşılaştırması yapılamamıştır.

Sonuç olarak, koyun ve sığırlara ait karaciğer ve akciğerlerden elde edilen kistlere ait; kist sıvıları, germinal membranları, kistler içerisinde görülen kız keselerine ait kist sıvıları ve bu kız keselerin germinal membranları ve protoskoleksler kullanılarak yapılan SDS-PAGE ile protein bantlarının araştırıldığı bu çalışmada, tüm antijenik yapılarda ortak bantın 66 kDa olması, bunun echinococcosis'e spesifik bir antijen olabileceği kanaatini oluştururken, lipid profili açısından ise aynı hayvanın aynı dokusundan köken alan kız kese ile protoskolekslerin oldukça benzer profile sahip olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Barış İ., Şahin A., Bilir N., Kalyoncu AF., Emri AS., Akhan O., Barış B., Çopur AS., Selçuk ZT., 1989. Hidatik Kist Hastalığı ve Türkiye'deki Konumu. Türkiye Akciğer Hastalıkları Vakfı Yayını, No:1 Ankara.
- Bulut H., Doymaz MZ., 2001. Blotlama Teknikleri ve Mikrobiyolojide Kullanımı. In: Durmaz R. (Ed.) Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. baskı, 123-137.
- Burgu A., Doğanay A., Güvenç B., Sarımehtemtoğlu HO., Kalınbacak F., 2000. Analysis of fluids of hydatid cysts from sheep by SDS-PAGE and determination of specific antigens in protein structure by Western Blotting. Tr J Vet Anim Sci., 24, 463-500.
- Dar FK., Alkarmi T., 1997. Public health aspects of cystic echinococcosis in the Arab countries. Acta Tropica., 67, 125-132.
- Güralp N., 1981. Helmintoloji. İkinci baskı. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay., 368.
- Hahn-Deinstrop E., 2007. Applied Thin-Layer Chromatography, 2. ed., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Hira PR., Bahr GM., Shweiki HM., Behbehani K., 1990. An enzymelinked immunosorbent assay using an arc 5 antigen for the diagnosis of cystic hydatid diseases. Ann Trop Med Parasitol., 84, 157-162.
- Kanwar JR., Kaushik SP., Sawhney IM., Kamboj MS., Mehta SK., Vinayak VK., 1992. Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. J Med Microbiol., 36, 46-51.
- Köksal F., Serin MS., Kekeç Y., Sadri YE., 1995. İnsan ve hayvan kökenli kist hidatik sıvılarının SDS-PAGE metoduyla analizi ve Western blot metodunun klinik önemi. T Parazitol Derg., 19, 221-229.
- Morris DL., Richards KS., 1992. Hydatid Disease. Butterworth-Heinemann Ltd. Linarere House, Jordan Hill. Oxford OX2 8DP.
- Musiani P., Piantelli M., Lauriola L., Arru E., Pozzuoli R., 1978. *Echinococcus granulosus* specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. J Clin Pathol., 31, 475-478.
- Rickard MD., Lightowers MW., 1986. Immunodiagnosis of Hidatik Disease. In: Thompson RCA Ed., The Biology of *Echinococcus* and Hydatid Disease. George Allen and Unwin, London., 217-249.
- Sharma SD., Mullenax J., Araujo FG., 1987. Westernblott analysis of the antigens of T.gondii recognized by human IgM antibodies. J Immunol., 131, 977-978.
- Şaşmaz E., Hashempoor GR., Bahiar IH., Yuluğ N., 1995. *Echinococcus granulosus* 'un karşılaştırmalı antijenik analizi. T Parazitol Derg., 19, 83-87.
- Şimşek S., Köroğlu E., 2004. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot

(EITB) for immunodiagnosis of hydatid diseases in sheep. *Acta Tropica.*, 92, 17-24.

Şimşek S., Ütük AE., Köroğlu E., 2006. Hidatik kist sıvısından antijen B (Agb)'nin kısmi purifikasyonu

ve koyun hidatidosisinin tanısındaki etkinliği. *Fırat Üniv Sağ Bil Derg.*, 20 (5), 337-340.

Reiner Westermeier R., 2005. *Electrophoresis in Practice*, 4. ed., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.