

Ekinokokkozis'te Germinal Membran ve Kist Sıvısının Raman Spektroskopisi ile Moleküler Düzeyde Biyokimyasal Analizi

Biochemical Analysis of Germinal Membrane and Cyst Fluid by Raman Spectroscopy in Echinococcosis

✉ Berna Hamamcı¹, ✉ Güneş Açıköz¹, ✉ Erol Kılıç², ✉ Kerem Karaaslan³, ✉ Ülfet Çetinkaya⁴,
✉ Tülin Durgun Yetim³, ✉ İbrahim Yetim²

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Hatay, Türkiye

²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

³Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

⁴Erciyes Üniversitesi, Halil Bayraktar Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Kayseri, Türkiye

Cite this article as: Hamamcı B, Açıköz G, Kılıç E, Karaaslan K, Çetinkaya Ü, Durgun Yetim T, Yetim İ. Ekinokokkozis'te Germinal Membran ve Kist Sıvısının Raman Spektroskopisi ile Moleküler Düzeyde Biyokimyasal Analizi. Türkiye Parazit Derg 2019;43(4):175-81.

ÖZ

Amaç: Hydatidosis, *Echinococcus granulosus*'un larva evresinin neden olduğu zoonotik paraziter bir enfeksiyondur. Çalışmada, karaciğer tutulumu olan hastaların cerrahi sırasında elde edilen germinal membran ve kist sıvılarının Raman spektroskopisi ile moleküler düzeyde biyokimyasal yapılarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmada, germinal membran ve kist sıvılarının mitokondriyal gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonları belirlenmiş ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Örneklerde Raman spektroskopisi kullanılarak 300-1800 cm⁻¹ arasındaki spektral bantlar incelenmiştir.

Bulgular: PZR analizleri sonucunda hastalardan elde edilen germinal membranlarda ve kist sıvılarında yaklaşık 400 bp büyüklüğünde DNA bandı elde edilmiştir. Germinal membranda 780, 880, 970, 1151, 1200, 1270 cm⁻¹'de, kist sıvısında 780 ve 1200 cm⁻¹'de farklı pikler gözlenmiştir. 1333-1335 cm⁻¹'de elde edilen en şiddetli spektral bantların CH₃CH₂ kollajen ve polinükleotit zincirini gösteren modlar olduğu belirlenmiştir. Bu ise, *E. granulosus*'un moleküler düzeyde biyokimyasal yapısını gösteren spesifik pik olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç: Mikroorganizmaların tanımlanmasında ve biyolojik dokuların biyokimyasal analizlerinde; moleküler, serolojik ve konvansiyonel farklı yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlere ek olarak Raman spektroskopisinin hızlı, tahribatsız ve non-invaziv bir yöntem olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir. Dolayısıyla mikroorganizmaların temel biyokimyasal bileşenlerinin moleküler düzeyde analiz edilebilmesi bakımından alternatif bir yöntem olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Echinococcus granulosus*, Raman spektroskopisi, biyokimyasal analiz

ABSTRACT

Objective: Hydatidosis is a zoonotic parasitic infection caused by the larval stage of *Echinococcus granulosus*. The aim of this study was to investigate the biochemical structures of germinal membrane and cyst fluids obtained from patients with liver involvement during surgery, by Raman spectroscopy at the molecular level.

Methods: Molecular characterization of germinal membrane and cyst fluid according to mitochondrial gene region was determined and phylogenetic analysis was performed. Raman spectroscopy was used in samples and spectral bands between 300 and 1800 cm⁻¹ were examined.

Results: As a result of PCR, approximately 400 bp DNA band was obtained from germinal membranes and cyst fluids gathered from patients. Peaks were observed at 780, 880, 970, 1151, 1200, 1270 cm⁻¹ for germinal membrane and at 780 and 1200 cm⁻¹ for



Geliş Tarihi/Received: 06.02.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 21.08.2019

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Dr. Berna Hamamcı, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Hatay, Türkiye

Tel/Phone: +90 533 436 97 99 **E-Posta/E-mail:** uzberna@hotmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-3411-2935

cyst fluid. The highest spectral bands were obtained at 1333-1335 cm^{-1} and were determined to be modes indicating the CH₃CH₂ collagen and polynucleotide chain.

Conclusion: In the identification of microorganisms and biochemical analysis of biological tissues; different diagnostic methods such as molecular, serological and conventional methods are used. In addition to these methods, Raman spectroscopy has been shown in studies to be a fast, non-destructive and noninvasive method. Therefore, it is thought to be an alternative method for analyzing the basic biochemical components of microorganisms at molecular level.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, Raman spectroscopy, biochemical analysis

GİRİŞ

Hidatik kist (HK), *Echinococcus granulosus*'un larva evresinin neden olduğu zoonotik bir paraziter enfeksiyondur. Ülkemiz de dahil hayvancılığın yaygın olduğu birçok ülkede önemli bir halk sağlığı sorununu teşkil etmekte ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır (1). *E. granulosus*'un larva formu, ara konakta kistik özellik göstermekte ve çoğu olguda benign tümör gibi davranmaktadır (2). Zoo-coğrafik yapı farklılığı, iklim koşulları, sosyo-ekonomik durum, halkın eğitim düzeyine bağlı olarak HK prevalansı değişiklik gösterir. *E. granulosus*'un genetik çeşitliliği; rastlantısal ara konak olan insanlarda hastalığın epidemiyolojisi, tedavisi ve kontrolü için oldukça önemlidir (3).

Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar ile *E. granulosus*'un taksonomisi yeniden belirlenmiş ve yeni suşlar ortaya çıkmıştır. Mitokondriyal DNA sekanslarına göre on farklı genetik yapı (G1-10 genotipleri) tanımlanmıştır. Suşlar arasındaki ara konak ve gelişimsel farklılıklar parazitle mücadeleyi ve kontrol çalışmalarını olumsuz yönde etkilemektedir (4). Son yapılan çalışmalara göre *E. granulosus* suşları; G1-G3 *E. granulosus sensu stricto*, G4 *E. equinus*, G5 *E. ortleppi* ve G6-G10 ise *E. canadensis* olarak sınıflandırılmaktadır (5).

Dünyada bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda bu genotiplerden en yaygınının G1 genotipi olduğu belirlenmiştir. *E. granulosus sensu stricto* (G1=evcil koyun suşu) insan ve hayvanlarda kistik ekinokokkozusa neden olan etiyolojik ajanlardan biridir. Bu sesto dünya çapında yaygın bir dağılıma sahiptir. Özellikle köpeklerle yakın temasta olabilen hayvan yetiştiricilerinin bulunduğu fakir ve kırsal kesimi etkilemektedir (6).

Echinococcus türlerinin ara konaklarda oluşturdukları kistler; dıştan damarsız, eozinofilik laminar tabaka ile en içte protoskolekslerin geliştiği germinal membrandan (10-15 μ) oluşur. *E. multilocularis* haricindeki türlerin kistlerinde konak dokusu tarafından çevrelenmiş; endotel hücreleri, eozinofiller ve dev hücreleri içeren, fibroblast ve kapillerden zengin fibröz bir adventisiya tabakası bulunur (7-9). Kist tabakalarının biyokimyasal yapısı, hastalığın metabolizması, fizyolojisi ve immünolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (10,11).

Raman spektroskopisi (RS); tahribatsız olarak herhangi bir bileşik, doku veya sıvının hızlı bir şekilde tanımlanma, birbirinden farklı numuneleri analiz edebilme özelliğinden dolayı, son yıllarda tıbbi bilimlere açısından önemi giderek artmaya başlamıştır. Kan, idrar, tükürük, ter gibi vücut sıvılarında, hastalık veya hücre yüzey antijenlerinin belirlenmesi amacıyla özellikle son 20 yılda birçok çalışmada kullanılan güçlü bir analitik tekniktir (12-18). Toksik ajanlar/ilaçlar, hastalık, hücre ölümü ve farklılaşması gibi hücre biyokimyasal değişikliklerin belirlenmesinde RS oldukça etkindir. Bazı biyolojik numunelerin incelenmesinde RS tek başına yetersiz kalmaktadır. Bundan dolayı Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) yöntemi kullanarak, Raman sinyallerinin şiddeti artırılabilir (16-19). Işının gümüş, altın, bakır gibi bazı metallerin iletim bandındaki elektronları uyarılmasıyla üzerine absorbe edilen moleküllerde görülen zenginleşmeye Raman

zenginleşmesi veya SERS denir. RS'nin tek başına yeterli olmadığı bazı incelemelerde SERS metodunun kullanılması avantaj sağlamaktadır (20,21). SERS metodu, metal nanoparçacıklar üzerinden analiz edilmesi yönünden RS'den ayrılır. Metal nano parçacıklar, yüzeyde lokalize elektromanyetik alan oluşturarak RS şiddetini artırır. SERS metodu günümüze kadar; biyolojik numunelerin analizi, parazitemi durumu, hücrenin biyokimyasal süreçleri, hastalıkların tanısı, kanser hücrelerin tanımlanması, bakteri türlerinin sınıflandırılması, gen ekspresyon tahmini ve ilaçların teşhisi gibi amaçlarla uygulanmaktadır (22-26). Metalik nano yapılar arasında, altın nanoparçacıklar (AuNP) ve gümüş nanoparçacıklar (AgNP), tıbbi alanda büyük ilgi görmektedir. AgNP birbirine metalik olarak bağlanmış gümüş atomlarından oluşan nano boyutlu yapılardır. Bu partiküller farklı fiziksel, optik ve kimyasal özelliklerinin yanında, anti-bakteriyel etkileri de bilinmektedir. AgNP'ler (elektriksel olarak pozitif) ile parazit (elektriksel olarak negatif) arasındaki elektrostatik etkileşimle skolitik etki gerçekleştirebilir. Ancak SERS metodunda kullanılan AgNP'ler skolitik etki göstermezler.

Çalışmada ekinokokkoziste germinal membran ve kist sıvılarının analizleri ile biyokimyasal yapılarının incelenmesi için Raman spektroskopisinin hızlı, tahribatsız ve non-invaziv bir yöntem olduğu düşünüldüğünden dolayı mikroorganizmaların temel biyokimyasal bileşenlerinin moleküler düzeyde analiz edilebilmesi bakımından alternatif bir yöntem olarak SERS metodu ile incelenmesi ve *E. granulosus*'un larval formunun moleküler düzeyde biyokimyasal haritasının gösterilmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Örneklerin Elde Edilmesi

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi'nde, karaciğer kist hidatik tanısı konulan ve hastaların cerrahi tedavisi sırasında elde edilen germinal membran ve kist sıvıları kullanılmıştır. Çalışmada germinal membran ve kist sıvıları mitokondriyal gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonları belirlenmiş ve filogenetik analizleri yapılmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Total genomik DNA örneklerinden mitokondriyal JB3 ve JB4.5 primerleri kullanılarak *CO1* geninin yaklaşık 400 bç'lik bölgesi çoğaltılmış ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünü elde edilmiştir (Tablo 1). DNA izolasyonu Gene AllExgeneCell SV Mini Kit (GeneAll, Korea) prosedürüne göre çalışılmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinden Sanger dizileme protokolü ile DNA dizi analizi yapılmıştır. BLAST analizi ve MEGA programı ile filogenetik analizleri yapılarak DNA dizi analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Mitokondriyal PZR işleminde toplam 25 μ L'lik hacimde bir karışım hazırlanmıştır (Tablo 2). PZR amplifikasyonunda 95 °C'de 5 dk başlangıç denatürasyonunu takiben, toplam 35 döngü 95 °C'de 45 sn denatürasyon, 55 °C'de 45 sn primer birleşmesi ve 72 °C'de 45 sn sentezi gerçekleştirilmiştir. Son döngüyü takiben 72 °C'de 7 dk son uzama işlemi yapılmıştır.

Örneklerin Hazırlanması

On hastanın karaciğerinden elde edilen fertil kist sıvıları ve aynı hastalara ait germinal membranlar analizler yapılmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Fertil kist sıvıları santrifüj edilerek protoskolekslerin çökmesi sağlandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılarak dipteki kısım kullanılmıştır. Germinal membranlardan ise bir kesit alınarak quartz camlı ve Raman sinyallerinde değişime neden olmayan lamalar üzerine yerleştirilmiştir. Hazırlanan numuneler 20 µL gümüş nanoparçacık kullanılarak spektrumları elde edilmiştir.

AgNP'lerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

AgNP'ler Lee ve Meisel (27) yöntemine göre sentezlenmiştir. Oluşan AgNP'leri karakterize etmek için UV/Görünür bölge spektrofotometresi ve Taramalı Elektron Mikroskobu analiz ünitesi (JEOL 5500/OXFORD Inca-X) kullanılmıştır.

Raman Spektroskopisi

Yapılan incelemelerde 785 nm lazere ve Charge-Coupled Device detektöre sahip Renishaw in Via RS kullanılmış ve 300-1800 cm⁻¹ arasındaki spektral bantlar incelenmiştir. Tüm ölçümler için elde etme süresi, lazer gücü ve exposure süresi sırasıyla 10 sn, 5 mW ve 1 sn olarak alındı. Veriler, WiRE 3.2 yazılımı (Renishaw plc,

Wotton-under-Edge, İngiltere) kullanılarak elde edildi. Spektra ön işleme (yani, dördüncü polinom taban çizgisi düzeltmesi ve vektör normalizasyonu), analiz ve çizim, MATLAB® (Matlab 7.13, Mathworks, Natick, MA, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Bu çalışma için etik kurul onayı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (etik kurul no: 19/012017/02).

BULGULAR

PZR analizleri sonucunda hastalardan elde edilen germinal membranlarda ve kist sıvılarında yaklaşık 400 bç büyüklüğünde DNA bandı elde edilmiştir (Şekil 1).

Mitokondrial CO1 gen bölgesi dizi analizleri sonuçları 3 grupta sınıflandırılmıştır. Hasta gruplarının karşılaştırma sonucunda dizimlerinde bazı farklılık saptanmış olup izolatlar arasında genetik akrabalıkları 3 grubunda %99 oranında elde edilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda izolatların *E. granulosus* (G1-G3) kompleksi içinde yer aldığı gözlenmiştir. Elde edilen veriler BLAST search ile Genbank'ta bulunan sonuçlarla karşılaştırılması sonucunda; Hatay ilinden toplanan ve bu çalışmaya dahil edilen insan izolatlarının hepsinin *E. granulosus sensu stricto* (G1) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).

Tablo 1. *Echinococcus granulosus* izolatlarının PZR analizinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler

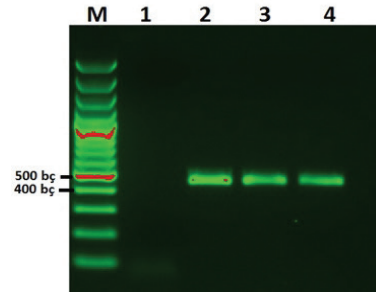
Tür	Gen	Primer	Sekans	Amplicon
<i>Echinococcus</i> spp.	mt-CO1	JB3 JB4.5	(5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') (5'-TAAAGAAAGAACAATGAAAATG-3')	400 bç

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

Tablo 2. Mitokondriyal PZR işleminde kullanılan PZR karışımı ve PZR amplifikasyonu

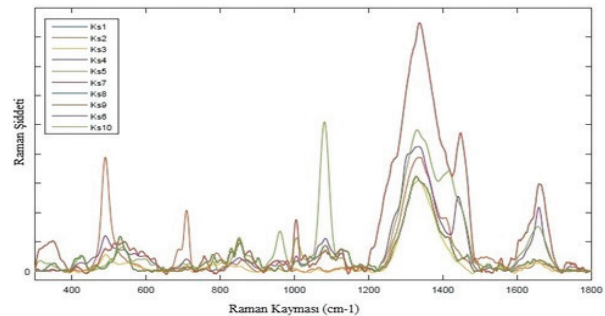
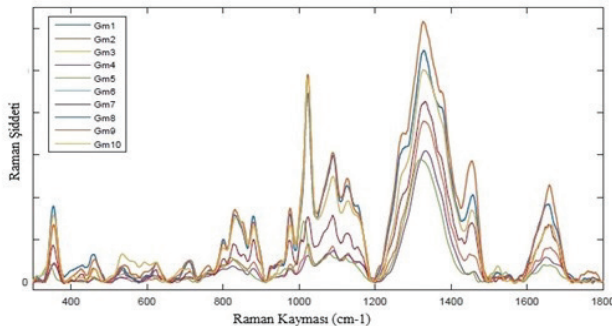
PZR karışımı (µL)	PZR amplifikasyonu
10x reaksiyon buffer 2,5	95 °C 5 dk
dNTP (2,5 mM) 2	95 °C 45 sn
JB3 (20 pmol/µL) 0,5	55 °C 45 sn
JB4.5 (20 pmol/µL) 0,5	72 °C 45 sn 35 döngü
Taq DNA pol. (5 ünt./µL) 1	72 °C 7 dk
DNA 1	
Distile su 17,5	
Toplam 25	

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu, sn: Saniye, dk: Dakika



Şekil 1. *E. granulosus* PZR ürünlerinin %1,5'lik etidyum bromidle boyanmış agaroz jeldeki görüntüsü; M: 100 bç DNA ladder, 1: Negatif kontrol, 2-3-4: Hasta örnekleri

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu



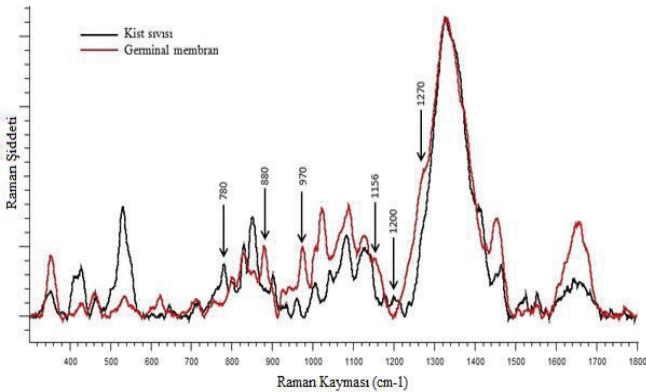
Şekil 2. Çalışmada elde edilen izolatların ve referans dizilerin filogenetik ilişkisi

Moleküler çalışmaları yapılmış olan bu örnekler ayrıca RS ile incelenmiştir. Çalışmada, fertil kistlerden elde ettiğimiz germinal membran ve kist sıvılarının Raman spektrumları arasında belirgin bazı farklılıklar elde edilmiştir. Elde edilen bu spektral pikler literatürdeki normal ve patolojik dokulardan elde edilen Raman spektrumlarının oluşturulduğu veriler ile karşılaştırılmıştır (17,28-42).

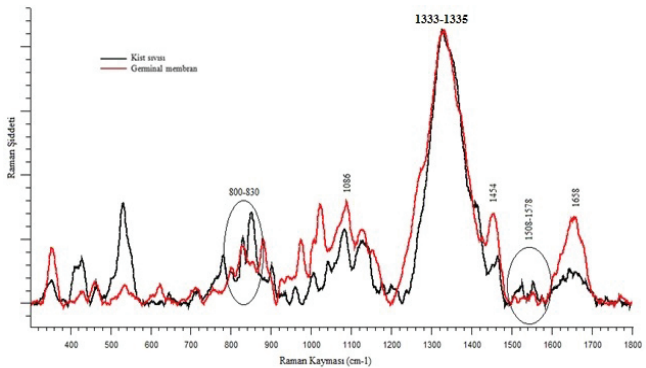
Yapılan çalışmada elde edilen spektrumların hangi biyokimyasal bileşenlere ait olduğu Tablo 3'de gösterilmiştir. Germinal membran ve kist sıvısının içeriğindeki farklılıklardan dolayı karakteristik pikler değerlendirilmiştir (Şekil 3). Örneklerin Raman spektrumları moleküler düzeyde protein, karbonhidrat, yağ ve nükleik asitlere ait biyokimyasal haritalanması elde edilmiştir.

Germinal membran ve kist sıvısı için 300-1800 cm^{-1} arasındaki spektral bölge incelenmiştir. 780, 880, 970, 1156, 1200, 1270 cm^{-1} 'de belirgin olarak farklı pikler gözlenmiştir. Elde edilen bu piklerden 880, 970, 1156, 1270 cm^{-1} noktalarında germinal membranda güçlü spektral pikler gözlenirken kist sıvısında bu noktalarda spektral özellik görülmemiştir. Kist sıvısında ise 780 ve 1200 cm^{-1} noktalarında farklı spektral bantlar gözlenmiştir (Şekil 4).

Germinal membrandan elde edilen spektrumlardaki şiddetli pikler; 880, 1020, 1086, 1333-1335, 1454 ve 1662 cm^{-1} bantlarında elde edilmiş ve patolojik dokuların teşhisi için genellikle normal dokulara göre protein deformasyonlarını gösteren önemli piklerdir. 1454 cm^{-1} 'deki, metilen ($-\text{CH}_2-$) deformasyonuna bağlı



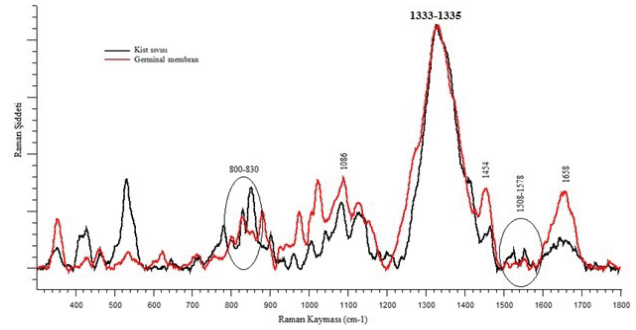
Şekil 3. On hastanın germinal membran ve kist sıvılarından elde edilen Raman spektrumları



Şekil 4. Germinal membran ve kist sıvılarının Raman spektrumlarından elde edilen farklı pikler

Amid II proteininin; 1658 cm^{-1} 'de elde edilen spektral bandının ise karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gerilmesine bağlı Amid I proteinlerinin tepe noktaları olarak bulunmuştur. 1274 cm^{-1} 'deki pikin ise Amid III'e ait olduğu düşünülmektedir.

Germinal membranın Raman spektrumunda 752-1006 cm^{-1} 'de elde edilen spektral bantlar proteinlerin farklı titreşim modlarını ve aminoasitlerin kalıntıları olarak gösterilebilir. Normal dokularda lipitler baskın spektrum vermektedir ancak bening tümörlerde genellikle yüksek protein içeriğine sahip olduğundan bulgularımızda proteinlere ait titreşim modları daha baskın elde edilmiştir. Ancak bu titreşim modları proteinlerin küçük yoğunluk varyasyonlarıyla sınırlandırılarak gösterilmiştir. Germinal membran da nükleik asitler, triptofan ve fenil alanin proteinlerinin daha yüksek sinyaller oluşturduğunu ancak



Şekil 5. Germinal membran ve kist sıvılarının Raman spektrumlarından elde edilen ortak pikler

Tablo 3. Germinal membran ve kist sıvılarından elde edilen raman spektrumunun temel bantları

Raman kayması	Biyomolekül
622	Fenilalanin
780	Urasil bazı
802	Triptofan
800-830	Prolin, hidroksiprolin, triozin, fosfodiester bağları, DNA şeker fosfat omurgası
880	hidroksiprolin
943	Prolin, valin
974-978	CH_3 proteinlerin deformasyonu
1006	Karotenoitler
1086	Fosfolipit
1124	Fosfolipit
1200	Amide III
1270	Amide III
1333-1335	Polinükleotit (DNA pürin bazları)
1454	Metilen ($-\text{CH}_2-$) deformasyonuna bağlı Amid II
1508	Sitozin
1520	Karotenoitler
1577	Amid II protein ve nükleik asitlerin
1658	Karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gerilmesine bağlı Amid I

fosfolipit, prolin ve valin aminoasitlerin oluşturduğu Raman sinyallerinin düşük olduğu gözlenmiştir.

Protein ve aminoasitlere ait Raman spektrumları; 622 ve 1006 cm^{-1} (fenilalanin), 802 cm^{-1} (triptofan), 880 cm^{-1} (hidroksiprolin), 943 cm^{-1} 'de (prolin ve valin) olarak saptanmıştır. 974-978 cm^{-1} 'de elde edilen spektral bant ise protein deformasyonu şeklinde yorumlanmıştır.

Elde edilen diğer spektral pikler incelendiğinde; 1151 cm^{-1} 'de; C-C, C-N gerilmesi (proteinler), normal dokuda olmayan karotenoidler, 1274 cm^{-1} 'de tipik fosfolipitler, proteinlerde ki Amid III bandı ve Alfa heliks proteinlerde ki C-N gerilmesi, 880 cm^{-1} 'de C-C-N⁺ simetrik gerilme, hidroksiprolin ve triptofan, 970 cm^{-1} 'de lipitler (kolesterol), fosforilasyona uğramış proteinlerin ve hücrel nükleik asitlerin fosfo monoester grupları olarak belirlenmiştir (Şekil 4).

715, 1020 ve 1333-1335 cm^{-1} 'de elde edilen Raman bantlarının nükleik asitlere ait olduğu belirlenmiştir. Genellikle kanserleşmiş dokularda görülen 1086 cm^{-1} 'de oluşan tepe noktasının şekere (C₂OH) ait olan önemli bir pik olarak saptanmıştır.

Kist sıvısından elde edilen spektral pikler değerlendirildiğinde ise, 780 cm^{-1} 'de urasil bazı ve sitozin/urasil nükleotidleri, 1200 cm^{-1} 'de nükleik asitler, fosfatlar ve Amide III proteinlerine ait spektral titreşim modlarının biyokimyasal özellikleri elde edilmiştir (Şekil 4).

Germinal membran ve kist sıvısının Raman spektrumunda aynı spektral desenlerden elde edilen pikler değerlendirilmiştir. 800-943 cm^{-1} 'deki spektral pikler; protein bantları, tümörlerin yapısal protein modları, prolin ve hidroksiprolinin C-C gerilmesi, fosfodiester bağları, DNA'nın şeker fosfat omurgası ve tirozine ait titreşim modları olarak bulunmuştur. 1086 ve 1124 cm^{-1} 'deki spektral pikler ise; fosfolipitlere ait olarak belirlenmiştir. Hem germinal membran hem de kist sıvılarından elde ettiğimiz 1508, 1520, 1554, 1577 cm^{-1} 'deki spektral pikler sırasıyla; sitosin, karotenoidler, Amid II protein ve nükleik asitlerin titreşim modlarına ait olduğu bulunmuştur (Şekil 5).

Membran oluşumuna fosfolipit, serbest yağ asidi ve kolesterol, sıvıların içeriğinde ise sadece fosfolipitlerin bulunduğu, her ikisinin yapısının yoğun antejinik özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. 1333-1335 cm^{-1} 'de elde edilen en şiddetli spektral bantın CH₃CH₂ kollajen ve polinükleotit (DNA pürin bazları) zincirini gösteren modlara ait olduğu belirlenmiştir. Bu Raman bandı *E. granulosus*'un moleküler yapısını gösteren spesifik bir pik olarak değerlendirilmiştir. 1658 cm^{-1} 'deki spektral bantın ise α heliks yapılı ve Amid I proteinlerine ait olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu spektral desenin germinal membranda daha yüksek bir titreşim modu gösterdiği gözlenmiştir. 1658 cm^{-1} 'deki pik, kanserli hücrelerdeki amino asitlerin CH₃ asimetrik deformasyonuna karşılık gelmektedir (Şekil 5).

TARTIŞMA

Bu çalışmada RS kullanılarak SERS metodu ile *E. granulosus*'a ait germinal membran ve kist sıvılarının moleküler düzeyde biyokimyasal kompozisyonları belirlenmeye çalışıldı.

Bir hücrenin Raman spektrumu, hücrenin biyokimyasal bileşiminin zengin bir "parmak izini" temsil eder. Bu nedenle farklı hücrel tepkileri başlatan farklı toksik maddeler ve biyokimyasal değişiklikler Raman spektrumlarında belirgin olarak ortaya konulabilmektedir. Fizyolojik koşullarda muhafaza edilen canlı

hücrelerden herhangi bir invaziv girişim ve kontrast artırıcı kimyasallar kullanılmasına gerek kalmadan RS ile hücrenin moleküler kompozisyonları belirlenebilmektedir (40).

Bugüne kadar yapılan araştırmalar incelendiğinde kemik, kornea, servikal doku, akciğer, göğüs, deri, gastrointestinal doku, beyin, karaciğer, tükürük, hem proteinleri, lenfositler, insan kan hücreleri ve kanser hücreleri gibi birçok biyolojik doku örnekleri RS ile incelenmiştir. Ancak *E. granulosus* ve diğer parazitlerin biyokimyasal yapılarını haritalayabilecek SERS metodu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda bildirilen biyolojik dokuların spektrumları ile *E. granulosus*'a ait germinal membran ve kist sıvılarının spektrumları karşılaştırılarak biyokimyasal kompozisyonları belirlenmeye çalışılmıştır.

Hidatik kistlerin biyokimyasal kompozisyonları hastalığın fizyolojisinde, metabolizmasında ve immünolojisinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca biyokimyasal varyasyon, farklı ara konaklardaki suş varyasyonunu da yansıtabilmektedir (43). Farklı ara konaklardan elde edilen hidatik kist tabakaları ve bunu çevreleyen konak dokusunun serolojik yöntemlerle biyokimyasal parametrelerinin araştırıldığı çalışmada; kolesterol, trigliserit, üre, ürik asit, kreatin ve bilirubin analizleri elde edilmiştir. Kolesterol, bilirubin ve kreatinin en yüksek konsantrasyonda germinal tabakada olduğu ve diğer organlara göre biyokimyasal analiz sonuçlarının konsantrasyon miktarlarının değiştiği bildirilmiştir (44).

Yapılan farklı çalışmalarda 2700-3500 cm^{-1} 'deki spektral bölge değerlendirildiğinde yağ asit zincirleri, fosfolipitler, kolesterol, kreatin, proteinler ve nükleik asitleri gösterilmiştir (17,45). Çalışmamızda ise 300-1800 cm^{-1} arasındaki spektral bölge değerlendirildiğinden dolayı germinal membran ve kist sıvısına ait nükleik asit, karbonhidrat, protein ve lipitlere ait spektral pikler analiz edilmiş fakat germinal membranda olması gerek kreatin gösterilememiştir.

Normal ve patolojik dokulardan elde edilen Raman spektrumları önemli farklılıklar göstermektedir. Normal dokuların spektral profili, yüksek seviyelerde lipitlerin göstergesidir. Hem benign hem de malign olan patolojik dokuların spektral profili, daha fazla protein ve daha az lipit varlığına işaret etmektedir. Ayrıca, patolojik dokular arasında, malign doku benign dokuya kıyasla nispeten daha fazla lipit içermektedir (39).

Zheng ve ark. (46) sağlıklı ve ekinokokkozisli hastaların serum örneklerinde RS kullanarak tanı ve tahminlerini gerçekleştirmişlerdir.

Cheng ve ark.'da (47) yapmış oldukları çalışmada 28 ekinokokkozis hastası ve 38 sağlıklı kişide RS yöntemi kullanılır. RS ölçümleri, iki grup kan serumu örneği üzerinde gerçekleştirmişlerdir. Raman spektrumları gösterisi olarak ekinokokkozisli kan serumunun yansıtıcılığının, normal insan kan serumundan daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Sağlıklı ve ekinokokkozisli kişilerde ki ortalama kesin tanı oranının %92,121 olarak elde etmişlerdir. Sonuç olarak Zheng ve ark. (46), Cheng ve ark.'nın (47) yaptıkları çalışma sonucunda geleneksel tanı yöntemleri ile karşılaştırıldığında RS'nin düşük maliyetli, kolay kullanımlı, ekinokokkozun hızlı analizi ve doğru teşhisi açısından avantajları olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Raman spektroskopinin ekinokokkozis için non-invaziv ve hızlı tespiti için önemli potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

E. granulosus'un larva formu olguların çoğunda benign bir tümör gibi davranmaktadır. Bu nedenle RS ile bu larval formun mikro

yapısını, dokunun ve kist sıvısının biyokimyasal bileşenlerini analiz etmek için önemli bir potansiyele sahiptir. Elde edilen spektrumların özellikleri, germinal membran ve kist sıvısının moleküler düzeyde biyokimyasal bileşimlerinde ki farklılıkları göstermekte avantaj sağlamaktadır.

SONUÇ

Mikroorganizmaların tanımlanmasında ve biyolojik dokuların biyokimyasal analizlerinde moleküler, serolojik ve konvansiyonel gibi farklı tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlere ek olarak Raman spektroskopisinin hızlı, tahribatsız ve non-invaziv bir yöntem olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir. Dolayısıyla mikroorganizmaların temel biyokimyasal bileşenlerinin moleküler düzeyde analiz edilebilmesi bakımından alternatif bir yöntem olacağı düşünülmektedir. Ayrıca bir sonraki çalışmalarda sağlam, kanserli dokularla karşılaştırmalı analizleri yapılarak tanı ve teşhisinde doğruluğunun ve güvenilirliğinin artırılmasını istiyoruz.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (etik kurul no: 19/012017/02).

Hasta Onayı: Alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu içinde olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Konsept: B.H., G.A., Dizayn: B.H., G.A., Veri Toplama veya İşleme: B.H., G.A., E.K., K.K., Ü.Ç., T.D.Y., İ.Y., Analiz veya Yorumlama: B.H., G.A., E.K., K.K., Ü.Ç., T.D.Y., İ.Y., Literatür Arama: B.H., G.A., E.K., K.K., Ü.Ç., T.D.Y., İ.Y., Yazan: B.H., G.A., E.K., K.K., Ü.Ç., T.D.Y., İ.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Özbilgin A, Kilimcioglu AA. Kistik echinococcosis. Özcel MA (Editör). Özcel'in tıbbi parazit hastalıklarında. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği 2007;541-66.
- Meerkhan AA. Biochemical Study of Germinal and Laminated Layers of Hydatid Cyst of Echinococcus granulosus and Surrounding Host Tissues Isolated from Different Intermediate Hosts. IJCEBS 2013;1:4.
- Budak Yıldırım FA, Yıldız K, Çakır Ş, Gazıyağcı AN. Kırıkkale Bölgesinde Koyun Kökenli Echinococcus granulosus İzolatlarının Moleküler Karakteri. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2010;16:245-250.
- Thompson RCA, Lymbery AJ. The nature, extent and significance of variation within the genus Echinococcus. Adv Parasitol 1988;27:209-58.
- Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae). Int J Parasitol 2013;43:1017-29.
- Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW. Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans—review of current knowledge. Int J Parasitol 2014;44:9-18.
- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. The Lancet 2003;362:1295-304.
- Czermak BV, Akhan O, Hiemetzberger R, Zelger B, Vogel W, Jaschke W, et al. Echinococcosis of the liver. Abdom Imaging 2008;33:133-43.
- Altıntaş N, Tınar R, Çoker A. Echinococcosis (1. baskı) Hidatoloji Derneği Yayın No:1. 2004; 129-238.
- Thompson RCA, Lymbery AJ. Echinococcus and hydatid disease, 1st ed. Wallingford, CAB International. 1995.
- Radfar MH, Iranyar N. Biochemical profiles of hydatid cyst fluids of Echinococcus granulosus of human and animal origin in Iran. J Vet 2004;4:435-42.
- Sikirzhytskaya A, Sikirzhytski V, McLaughlin G, Lednev IK. Forensic Identification of Blood in the Presence of Contaminations Using Raman Microspectroscopy Coupled with Advanced Statistics: Effect of Sand, Dust, and Soil. J Forensic Sci 2013;58:1141-8.
- Sikirzhytski V, Virkler K, Lednev I.K. Discriminant Analysis of Raman Spectra for Body Fluid Identification for Forensic Purposes. Sensors. 2010; 10: 2869-2884.
- Virkler K, Lednev IK. Raman spectroscopic signature of blood and its potential application to forensic body fluid identification. Anal Bioanal Chem 2010;396:525-34.
- An JH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. Body fluid identification in forensics. BMB Reports 2012;45:545-553.
- Notingher I. Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. Sensors 2007;7:1343-58.
- Talari Z, Movasaghi S, Rehman I. Raman spectroscopy of biological tissues. Journal Applied Spectroscopy 2015;50:1.
- Gremlich HU, Yan B. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials. Marcel Dekker Inc. New York, 2001.
- Kneipp K, Kneipp H, Kneipp J. Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates—from single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells. Acc Chem Res 2006;39:443-50.
- Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. Chem Phys Lett 1974;26:163-6.
- Kumar CSSR. Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012;553-86.
- Khlebtsov BN, Khanadeev VA, Panfilova EV, Bratashov DN, Khlebtsov NG. Gold nanoisland films as reproducible SERS substrates for highly sensitive detection of fungicides. ACS Appl. Mater. Interfaces 2015;7:6518-29.
- Guicheteau J, Argue L, Emge D, Hyre A, Jacobson M, Christesen S. Bacillus Spore Classification via Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis, Appl. Spectrosc 2008;62:267-72.
- Sun L, Irudayaraj J. Quantitative surface-enhanced Raman for gene expression estimation. Biophys J 2009;96:4709-16.
- Meng J, Tang X, Zhou B, Xie Q, Yang L. Designing of ordered two-dimensional gold nanoparticles film for cocaine detection in human urine using surface-enhanced Raman spectroscopy. Talanta 2017;164:693-9.
- Berger AG, Restaino SM, White IM. Vertical-flow paper SERS system for therapeutic drug monitoring of flucytosine in serum. Anal Chim Acta 2017;949:59-66.
- Lee PC, Meisel D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. J Phys Chem 1982;86:3391-5.
- Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H. Raman spectroscopy: Elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. Br J Canc 2006;94:1460-4.
- Cheng WT, Liu MT, Liu HN, Lin SY. Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. Microsc Res Tech 2005;68:75-9.
- Liu Z, Davis C, Cai W, He L, Chen X, Dai H. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. Proc Natl Acad Sci Unit States Am 2008;105:1410-5.
- Dukor RK. Vibrational spectroscopy in the detection of cancer. Biomedical Applications 2002;5:3335-59.

32. Chan JW, Taylor DS, Zwerdling T, Lane SM, Ihara K, Huser T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophys J* 2006;90:648–56.
33. Krafft C, Neudert L, Simat T, Salzer R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim. Acta Mol Biomol Spectros* 2005;61:1529-35.
34. Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Rao L, Kartha VB, et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study. *Biopolymers* 2006;81:179-93.
35. Sigurdsson S, Philipsen PA, Hansen LK, Larsen J, Gniadecka M, Wulf HC. Detection of skin cancer by classification of Raman spectra. *IEEE Trans Biomed Eng* 2004;51:10.
36. Stone N, Kendall C, Smith J, Crow P, Barr H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discuss* 2004;126:141-57.
37. Kendall C, Day J, Hutchings J, Smith B, Shepherd N, Barr H, et al. Evaluation of Raman probe for oesophageal cancer diagnostics. *Analyst* 2010;135:3038-41.
38. Schulz H, Baranska M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib Spectros* 2007;43:13-25.
39. Chowdary MV, Kumar KK, Kurien J, Mathew S, Krishna CM. Discrimination of normal, benign, and malignant breast tissues by Raman spectroscopy. *Biopolymers* 2006;83:556-69.
40. Huang J, Liu S, Chen Z, Chen N, Pang F, Wang T. Distinguishing Cancerous Liver Cells Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Technol Cancer Res Treat* 2016;15:36-43.
41. Chen Y, Dai J, Zhou X, Liu Y, Zhang W, Peng G. Raman spectroscopy analysis of the biochemical characteristics of molecules associated with the malignant transformation of gastric mucosa. *PLoS One* 2014;9:93906.
42. Liu CH, Zhou Y, Sun Y, Li JY, Zhou LX, Boydston-White S, et al. Resonance Raman and Raman spectroscopy for breast cancer detection. *Technol Cancer Res Treat* 2013;12:371-82.
43. Shaafie IA, Khan AH, Rambabu K. Biochemical profiles of hydatid cyst fluids of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Libya. *J Helminthol* 1999;73:255-8.
44. Merza ASW, Mero WMS. Study on Biochemical Parameters on Hydatid Cyst Layers (Laminated and Germinal) and Surrounding Host Tissues Isolated From Different Intermediate Host. *Science Journal of University of Zakhō* 2013;1:22-30.
45. Rehman S, Movasaghi Z, Tucker AT, Joel SP, Darr JA, Ruban AV, et al. Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: Identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ of the breast tissue. *J Raman Spectros* 2007;38:1345-51.
46. Zheng X, Lü G, Du G, Yue X, Lü X, Tang J, et al. Raman spectroscopy for rapid and inexpensive diagnosis of echinococcosis using the adaptive iteratively reweighted penalized least squares-Kennard-stone-back propagation neural network. *Laser Phys Lett* 2018;15:085702.
47. Cheng J, Xu L, Lü G, Tang J, Mo J, Lü X, et al. Study on the echinococcosis blood serum detection based on Raman spectroscopy combined with neural network. *Optoelectron Lett* 2017;13:77-80.