

Deneysel Çalışmalarda Çevresel Değişikliğe Maruz Kalan *Fasciola hepatica*'nın Salgıladığı Protein Miktarlarının Bir İleri Proteomik Yaklaşımla İncelenmesi

Investigation of the Abundance of Proteins Secreted by *Fasciola hepatica*, Which is Exposed to Environmental Change in Experimental Studies, with an Advanced Proteomic Approach

Orçun Haçarız¹, Ahmet Tarık Baykal²

¹TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye

²İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Ana konakçıdan çıkarıldıktan sonra çevresel değişikliğe maruz kalan *Fasciola hepatica*'nın salgıladığı protein miktarlarını bir ileri proteomik yaklaşımla incelemek.

Yöntemler: Son konakçıdan toplanan ergin *F. hepatica* parazitleri doğrudan fosfat tamponlu su (FTS, oda sıcaklığında) içerisine konuldu ve 37°C'de 2 saat bekletildi (Enstitü'ye 1 saat içerisinde getirildikten sonra). Daha sonra, FTS, bir revize *F. hepatica* protein veri bankası (*Universal Protein Resource; UniProt*) ve veri bağımsız edinim yöntemi ile ileri bir proteomik yöntem (yüksek başarımlı sıvı kromatografisine bağlı, elektriksel püskürtme ile iyonlaştırma ve dört kutup zaman bazlı ölçüm içeren kütle spektrometresi sistemi; nanoUPLC-ESI-QTOF-MS) kullanılarak incelendi.

Bulgular: Parazitlerle bekletilme sonrası FTS'nin proteomik analizinde, *cathepsin L protease 1*, *fatty acid binding protein 1 ve 2*, *thioredoxin peroxidase (TPx)*, ve *kunitz type proteinase inhibitor* tanımlandı. *Fasciola hepatica* TPx miktarı, bu çalışmada tanımlanan diğer proteinlerin miktarlarına göre yaklaşık olarak 2-6 kat daha fazla bulundu ($p < 0,01$).

Sonuç: Çevresel değişiklikten kaynaklanan parazit üzerindeki stres, TPx salınımının uyarılması ile ilişkili olabilir. İleri proteomik yaklaşımların uygulanması, parazit-konakçı etkileşiminin aydınlatılmasında ve parazite karşı etkili korunma yöntemlerinin geliştirilmesinde yararlı veriler sağlayabilir. (*Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2014; 38: 106-10)

Anahtar Sözcükler: *Fasciola hepatica*, TPx, proteomik, çevresel değişiklik, stres

Geliş Tarihi: 16.11.2013

Kabul Tarihi: 24.01.2014

ABSTRACT

Objective: Investigation of the abundance of proteins secreted by *Fasciola hepatica*, which is exposed to environmental change after it is removed from the main host, with an advanced proteomic approach.

Methods: Adult *Fasciola hepatica* parasites, obtained from the main host, were directly placed in phosphate-buffered saline (PBS, at room temperature) and incubated at 37°C for 2 hours (after arrival at the Institute within 1 hour). After this, without applying extra procedures, such as washing the parasites, secreted parasite proteins in PBS were investigated using an advanced proteomic method [a mass spectrometry system with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight source coupled to ultra performance liquid chromatography, nano UPLC-ESI-QTOF-MS] with a reviewed *F. hepatica* protein database (*Universal Protein Resource; UniProt*) and data-independent acquisition method.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Orçun Haçarız, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye. Tel: +90 262 677 33 77 * E-posta: orcun.hacariz@tubitak.gov.tr
DOI:10.5152/tpd.2014.3443

©Copyright 2014 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolog.org

©Telif hakkı 2014 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

Results: With the proteomic analysis of the PBS, after incubation with the parasites, cathepsin L protease 1, fatty acid-binding protein 1 and 2, thioredoxin peroxidase (TPx), and kunitz-type proteinase inhibitor were identified. The abundance of *Fasciola hepatica* TPx was approximately 2-6 times higher than that of the other proteins identified in this study ($p < 0.01$).

Conclusion: The stress on the parasite stem from environmental change could be associated with the stimulation of the secretion of TPx. The application of advanced proteomic approaches could provide useful data in the development of effective protective methods against the parasite. (*Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2014; 38: 106-10)

Key Words: *Fasciola hepatica*, TPx, proteomics, environmental change, stress

Received: 16.11.2013

Accepted: 24.01.2014

GİRİŞ

Fasciola hepatica, fasciolosis hastalığına neden olan bir trematoddur. Fasciolosis, dünyada birçok bölgede hayvancılık alanında önemli verim kayıplarına yol açan bir hastalıktır (1). Ayrıca, son yıllarda ülkemizde insanlarda fasciolosis olguları bildirilmektedir (2). Bu parazit genel olarak son konakçıda karaciğer harabiyetine neden olmaktadır. Ancak, nadir de olsa, insanlarda başka organlara da yerleşebilmektedir (3). Bu parazitten korunmak için henüz geliştirilmiş bir ticari aşı yoktur ve anti-helmintik ilaçlara (*triclabendazole* gibi) karşı dirençli olan *F. hepatica* parazitleri bulunmaktadır (4).

Parazit-konakçı ilişkisinin iyi bir şekilde anlaşılması, aşı veya daha etkili ilaç uygulamaları geliştirmek için çalışmalar yapılmaktadır (5, 6). Genel olarak, deneysel çalışmalarda, *F. hepatica* parazitleri son konakçının karaciğer kanallarından çıkarıldıktan sonra FTS (fosfat tamponlu su) içerisine bırakılmaktadır. Bu aşamadan sonra parazitler tekrar yıkanmakta ve FTS veya besi yerinde belli bir süre bekletildikten sonra proteomik analizler yapılmaktadır (7, 8). Ancak, parazitin karaciğer kanallarından çıkarıldıktan ve FTS içerisine bırakıldıktan sonraki salgıladığı protein miktarları doğrudan (parazitleri yıkama gibi ek işlemler uygulamadan) ileri bir proteomik teknikle araştırılmamıştır.

Son yıllardaki genetik ve proteomik alanındaki gelişmeler, parazite ait proteinlerin tanımlanmasında ve miktar tayininde önemli veriler sunmaktadır (5-7). Tanımlanan bazı önemli *Fasciola* sp. proteinlerinin tüm aminoasit dizileri bilinmektedir (www.uniprot.org). Her ne kadar *F. hepatica*'nın tüm proteinlerinin tüm aminoasitleri bilinmese de, ilgili kaynaktaki proteinler parazitin değişik önemli moleküler fonksiyonları ile ilişkilidir (proteoliz, peroksidaz aktivitesi gibi) (www.uniprot.org). Dolayısıyla, bu kaynaktaki *F. hepatica* protein verilerinin nitel ve nicel proteomik analizlerde kullanılması, parazitin bu moleküler fonksiyonlarının durumu hakkında bilgi verebilir.

Parazitlerin konakçı dışına çıkarıldıktan ve FTS içerisine konulduktan sonra salgılanan protein miktarlarının araştırılması, parazitlerin stres durumunda nasıl tepki verildiğinin anlaşılmasında ve dolayısıyla parazitten korunma veya tedavide etkili yöntemlerin geliştirilmesinde önemli olabilir.

Bu çalışmadaki amaç, son konakçıdan çıkarılan *F. hepatica* parazitlerinin FTS (fosfat tamponlu su) içerisine bırakıldıktan sonra ortamdaki protein miktarlarının güncel bir proteomik yöntem kullanılarak incelenmesidir.

YÖNTEMLER

Fosfat Tamponlu Su Hazırlanması ve Parazitler:

Fosfat tamponlu su (FTS), 140 mM NaCl (Sigma, Almanya), 2,7 mM KCl (Sigma, Almanya), 8,1 mM Na₂HPO₄ (Sigma, Almanya),

2 mM KH₂PO₄ (Sigma, Almanya) ve distile su kullanılarak hazırlandı ve pH 7,4 olarak ayarlandı. Ergin *Fasciola hepatica* parazitleri doğal olarak enfekte olan son konağa (sığıır) ait karaciğerden, rutin kesim sırasında, İstanbul'daki bir mezbahada temin edildi. Parazitler karaciğer kanallarından çıkarıldıktan sonra FTS (oda sıcaklığında) içeren bir tüpe bırakıldı ve Enstitü'ye getirildikten sonra (1 saat içerisinde), 37°C'de 2 saat bekletildi (8). Sıvı kısım (süpernatant) alındıktan sonra, iyice karıştırıldı (*vortex*) ve daha küçük parçalara bölünerek -80°C'de analiz olana kadar bekletildi.

Proteomik Analiz İçin Örnek Hazırlama

Proteomik analiz için örnek daha önce yayınlanan çalışmamızda bahsedildiği şekilde hazırlandı (6). Donmuş süpernatant çözül- dükten sonra protein miktarı Bradford yöntemi ile ölçüldü (9). Süpernatant eşit miktarda kütle spektrometresi için uygun bir denaturant (%0,1 RapiGest, Waters Corp., Milford, MA, Amerika Birleşik Devletleri) ile karıştırıldı. İlgili karışım ultra sonikasyona tabi tutulduktan sonra, 5 kDa filtre ve santrifüj (21000g, 5-15 dakika) kullanılarak ortamdaki tuz giderildi. Bir santrifügasyon işleminden (21000g, 4°C, 15 dakika) sonra, üst sıvı alındı ve protein miktarı tekrar daha önce anlatıldığı gibi ölçüldü. Bu sıvı 50 µg protein içerecek şekilde hazırlandı ve bahsedilen denaturant ile 50 µL'ye tamamlandı. Disülfid bağlarını kırmak için *dithiothreitol* (Sigma, Almanya) eklendi (5mM, 15 dakika, 60°C bekletme) ve oluşan serbest *thiol* moleküllerini alkile etmek için *iodoacetamide* (Sigma, Almanya) eklendi (10mM, 30 dakika, oda sıcaklığında ve karanlıkta). Proteinler, 50 µL proteomik dereceli tripsin (20 ng/µL) ile 37°C gece boyu muamele edilerek enzimatik olarak peptitlere parçalandı. Peptitleri bulunduran tüp analize kadar -80°C'de saklandı.

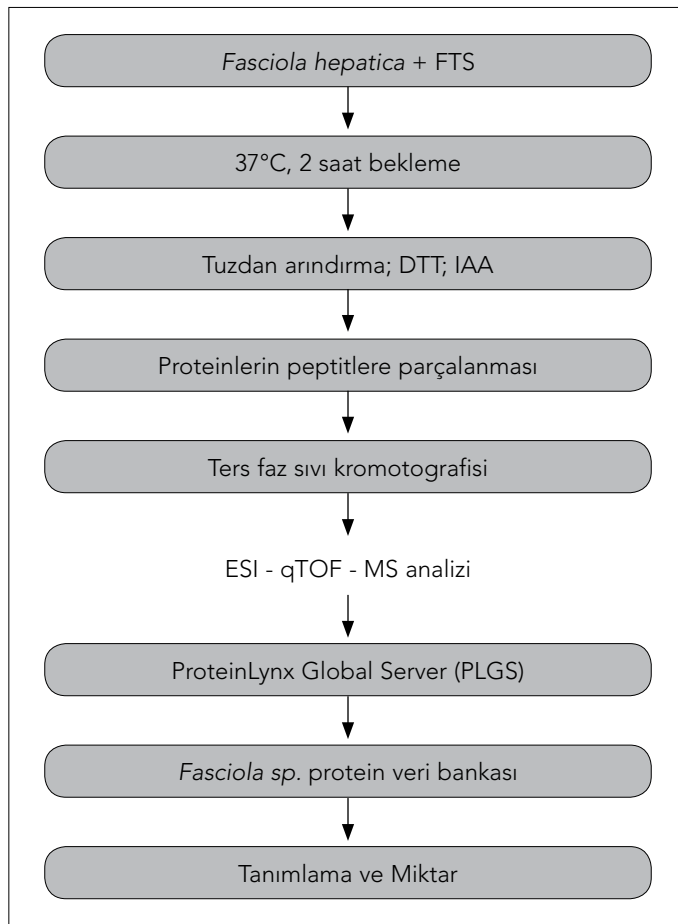
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Analizi

Proteomik analiz Şekil 1'de anlatılmaktadır. Peptitleri bulunduran solüsyona, 2 µL *acetonitrile* (ACN) (Sigma, Almanya), 2 µL *trifluoroacetic acid* (TFA) (Sigma, Almanya) ve 5 µL iç standart (50 fmol; *Saccharomyces cerevisiae enolase*) eklendi ve bu karışım 200 µL'ye *ammonium bicarbonate* (NH₄HCO₃) (Sigma, Almanya) ile tamamlandı. Bu karışım 400 rpm ve 60°C'de 2 saat karıştırıldıktan sonra 21000g'de 4°C 15 dakika santrifüj edildi. Bu karışımdan 2 µL yüksek başarımlı sıvı kromatografisine bağlı, elektriksel püskürtme ile iyonlaştırma ve dört kutup zaman bazlı ölçüm kaynağı içeren kütle spektrometresi sistemine [nanoUPLC (*nano ultra performance liquid chromatography*)-ESI (*electrospray ionization*)-QTOF (*quadrupole time of flight*)-MS (*mass spectrometry*), Waters, Amerika Birleşik Devletleri] gönderildi. Toplam 3 enjeksiyon yapıldı. Uygulanan sistem ile ilgili parametreler daha önceki çalışmamızda belirtildiği şekilde ayarlandı (6). Veri bağımsız edinim yöntemi (*data independent acquisition mode*; MS²), pozitif iyon V modu, MS ve MS/MS fonksiyonları (1,5 saniye aralıklarla 6V düşük enerji ve 15-40V yüksek enerji) kullanılarak pep-

Tablo 1. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (FTS) içeriğinin (parazitlerle bekletildikten sonra) proteomik analizi sonucu tanımlanan proteinler ve bu proteinlere ait veriler belirtilmektedir.

Protein no	Protein ismi	mW (Da)	pI (pH)	PLGS değeri	Peptitler	Kapsama (%)
Q7M4G1	<i>Fatty acid binding protein type 2 (FABP2)</i>	14926	5,9	913	5	48,74
B6DT35	<i>Thioredoxin peroxidase (TPx)</i>	24561	7,7	753	9	48,32
B9UN47	<i>Cathepsin L1D (CL1)</i>	36533	6,3	413	9	30,47
Q9TXD3	<i>6.751 kDa monomeric kunitz type proteinase inhibitor (KTPI)</i>	6585	6,3	830	4	37,93
Q7M4G0	<i>Fatty acid binding protein Fh15 (FABP1)</i>	14702	5,8	248	3	30,68

Protein no: Proteinin UniProt veri kaynağındaki numarası; mW(Da): moleküler ağırlık; pI(pH): izoelektrik nokta; PLGS değeri: PLGS yazılımı tarafından verilen tanımlama değeri; Peptitler: Protein tanımlamada gözlenen peptit sayısı; Kapsama (%): Proteinin tanımlanan yüzdesi.

**Şekil 1.** FTS içeriğinin (parazitlerle bekletildikten sonra) proteomik analizi genel hatlarıyla anlatılmaktadır

tit kütle/elektriksel yük (mass/charge; m/z) değerleri ve ürün iyon bilgisi elde edildi.

Protein Tanımlanması ve Miktar Analizi

Fasciola sp. veri bankası oluşturmak için, *Fasciola sp.*'ye ait revize (reviewed) tüm aminoasit dizisi bilinen protein dizileri uluslararası veri kaynağından (Universal Protein Resource; UniProt; www.uniprot.org) sağlandı. Bu veri bankasına bir iç standart proteinin (*S. cerevisiae* enolase) tüm aminoasit dizisi yine aynı kaynaktan eklendi. Kütle spektrometresinden elde edilen ham peptit verileri uygun bir

yazılım (ProteinLynx Global Server v2,3, Amerika Birleşik Devletleri) (PLGS) kullanılarak IDENTITY^E sistemi ile oluşturulan *Fasciola sp.* veri bankasına taratıldı (6). Fragment iyon toleransı 0,028 Da ve ana iyon toleransı 0,011 Da olarak ayarlandı. Veri bankası taramasında 3:7:1 parametresi (peptit için minimum 3 fragment iyon: protein için minimum 7 fragment iyon: protein için minimum 1 peptit) ayarlandı. Kromatografik pik genişliği, çözünürlük (rezolüsyon) ve enerji eşliği gibi parametreler daha önce anlatıldığı şekilde ayarlandı (6). PLGS değeri (PLGS score) 100'den büyük olan ve en az iki enjeksiyonda tanımlanan proteinler değerlendirmeye alındı. Protein miktar tayini PLGS programı kullanılarak daha önce detaylı olarak açıklandığı şekilde yapıldı (6). Bir protein için belirlenen yoğunluğu yüksek 3 peptit, iç standart peptitlerin yoğunluğunun ortalaması ile karşılaştırılarak, protein miktarı (ng) PLGS tarafından belirlendi. Her bir protein için, tanımlanan protein miktarı (ng) iç standart protein miktarına (ng) bölünerek oransal değerler elde edildi ve enjeksiyonlardan edilen bu oranların ortalaması alındı.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel bir sonuç olan PLGS değeri Monte Carlo işlem kümesi (algoritma) kullanılarak hesaplanmaktadır (6). Enjeksiyon bazlı protein miktarları arasındaki istatistiksel farklılık varyans analizi yöntemi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Tanımlanan *F. hepatica* proteinleri:

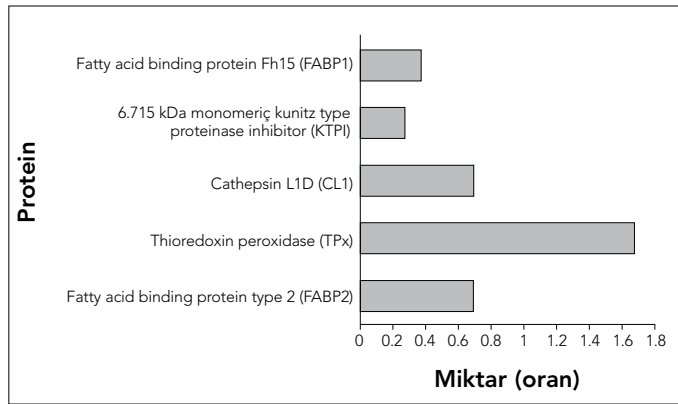
Parazitlerin bekletildiği FTS'nin proteomik analizi sonucunda *cathepsin L protease 1D (CL1)*, *fatty acid binding protein 1 (FABP1)*, *fatty acid binding protein 2 (FABP2)*, *thioredoxin peroxidase (TpX)*, ve *kunitz type proteinase inhibitor (KTPI)* proteinleri tanımlandı (Tablo 1).

Tanımlanan *F. hepatica* proteinlerinin miktarları:

Tanımlanan *F. hepatica* proteinlerinin oransal miktarları Şekil 2'de gösterilmektedir. *Fasciola hepatica* TPx miktarının bu çalışmada tanımlanan diğer proteinlerin miktarlarına göre yaklaşık 2-6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$). Diğer tanımlanan proteinlerden CL1 ve FABP2 miktarları birbirine benzer iken, bu miktar düzeyi FABP1 miktarına göre yaklaşık 2, KTPI miktarına göre yaklaşık 2,5 kat daha fazla bulunmuştur.

TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, son konakçıdan çıkarılan *F. hepatica* parazitlerinin FTS içerisine salgıladığı proteinleri güncel bir proteo-



Şekil 2. Parazitlerle bekletildikten sonra, FTS içeriğinde tanımlanan her bir proteine ait miktar (oran) gösterilmektedir. *Fasciola hepatica* TPx için bulunan miktar, tanımlanan diğer proteinlerin miktarlarına göre yaklaşık olarak en az 2, en fazla 6 kat daha fazla tespit edilmiştir ($p < 0,01$). *Fasciola hepatica* CL1 ve FABP2 miktarları birbirine yakın, FABP2 miktarı ise FABP1 miktarına göre yaklaşık olarak 2 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Protein miktarları arasında, KTPI miktarı en azdır

mik yöntem kullanarak tanımlamak ve bu proteinlerin miktarlarını araştırmaktır. Bu çalışmada, daha önce yapılan bağımsız çalışmalardan (7, 8) farklı olarak, *F. hepatica*'nın doğrudan strese bağlı yanıtını anlayabilmek için, FTS ile yıkama ve besi yerinde bekletilme işlemleri yapılmadı. Bu araştırmada, protein miktarı ölçme bakımından güncel ve güvenilir bir proteomik yöntem olan veri-bağımsız edinim yöntemi kullanıldı. Araştırmamızda, toplam 5 protein (CL1, FABP1, FABP2, TPx, ve KTPI) tanımlanmıştır.

Cathepsin L protease 1D (CL1) parazitin salgıladığı bir proteolitik enzimdir ve konakçı proteinlerin peptidlere parçalanmasında görev almaktadır (10). *Fatty acid binding protein 1* (FABP1) ve *fatty acid binding protein 2* (FABP2) konakçıda bulunan yağ asitlerini bağlama ve oluşan oksidatif ürünlerin azaltılmasında görev almaktadır (7, 11, 12). *Kunitz type proteinase inhibitor* (KTPI), tripsin gibi bir proteazın aktivitesini engelleyebilmektedir (13). *Thioredoxin peroxidase* (TPx) ise bir antioksidant olup alternatif aktive makrofaj tipinin oluşumunda ve dolayısıyla Th2 (*T-helper 2*) tip bir bağışıklık yanıtının gelişmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (14).

Çalışmamızda, TPx miktarı, diğer tanımlanan proteinlerin (CL1, FABP1, FABP2, KTPI) miktarlarına göre, daha fazla (2-6 kat) bulunmuştur. Bu durum, parazitin, stres durumunda metabolik faaliyetler ile ilgili proteinlerin salınımı yerine, Th2 yanıtını uyaran bir molekülün (TPx) uyarılmasını tercih ettiğini göstermektedir. Bu biyolojik mekanizma, TPx molekülü aracılığı ile alternatif aktive makrofajlar ve Th2 yanıtının uyarılmasında ve parazitten korunmada önemli olan Th1 (*T-helper 1*) bağışıklık yanıtının baskılanmasında önemli olabilir. Birçok parazit (*F. hepatica* dahil) makrofajlardaki arginase enziminin uyarılmasını tetikleyerek *L-arginine* molekülünün *L-ornithine*'e parçalanmasını, *L-ornithine* ise *ornithine aminotransferase* ile reaksiyona girerek kollajen sentezi ve fibroziste yer alan *proline* molekülünün oluşmasını sağlamaktadır (15, 16). Arginase enziminin yer aldığı bu yolak sonucunda oluşan makrofaj tipi (alternatif aktive makrofaj) Th2 tip bağışıklık yanıtı ile ilgili sitokinler (IL-4, IL-10 gibi) salgılamaktadır ki bu sitokinler Th1 (anti-paraziter yanıt) ile ilişkili sitokinlerin salınımını baskılamaktadır (15-17).

Fasciola hepatica tarafından TPx salınımının artması, ortamdaki oksidatif stresin azaltılması ile ilişkili olabilir. Bu protein tarafından uyarılan Th2 tip bağışıklık yanıtı, Th1 ilişkili klasik aktive makrofajların uyarılmasının engellenmesinde ve dolayısıyla bu makrofajlar tarafından salgılanan ve *F. hepatica* için zararlı olan nitrik oksit derişiminin (15, 18) azaltılmasında önemli olabilir.

Bir önceki çalışmamızda parazit içeriğinde FABP1 miktarının FABP2 miktarına göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (6). Bu araştırmada ise, FTS içeriğinde FABP2 proteininin miktarının FABP1 miktarına göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, parazitin stres durumunda, FABP2 protein salgılanmasının FABP1 salgılanmasına göre daha öncelikli olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, KTPI, miktarı en az tespit edilen proteindir. Stres durumunda parazitin proteolitik aktivitesinin azalması ile ilişkili olarak, KTPI proteininin sentezlenmesi ve salgılanması baskılanmış olabilir.

SONUÇ

Bu çalışmadaki bulgular, deneysel çalışmalarda oluşan çevresel değişikliğe bağlı gelişen stres durumunda, metabolizma ilişkili *F. hepatica* proteinlerinin salınımı yerine, Th2 tip bağışıklık ile ilişkili TPx salınımının öncelikli olabileceğine işaret etmektedir. Konakçı içerisinde de, bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan moleküller ve yaratılan oksidatif strese karşı, aynı veya benzer bir biyolojik mekanizma parazit tarafından tetiklenebilir. Bu tip bir mekanizmayı durdurabilecek TPx odaklı taktiklerin denenmesi (aşı, ilaç veya gen susturma gibi), *F. hepatica* enfeksiyonunun önlenmesinde veya tedavisinde önemli olabilir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - O.H.; Tasarım - O.H., A.T.B.; Denetleme - O.H., A.T.B.; Kaynaklar - O.H., A.T.B.; Malzemeler - O.H., A.T.B.; Veri toplanması ve/veya işlemesi - O.H., A.T.B.; Analiz ve/veya yorum - O.H., A.T.B.; Literatür taraması - O.H.; Yazıyı yazan - O.H.; Eleştirel inceleme - O.H., A.T.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - O.H.; Design - O.H., A.T.B.; Supervision - O.H., A.T.B.; Funding - O.H., A.T.B.; Materials - O.H., A.T.B.; Data Collection and/or Processing - O.H., A.T.B.; Analysis and/or Interpretation - O.H., A.T.B.; Literature Review - O.H.; Writing - O.H.; Critical Review - O.H., A.T.B.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Piedrafita D, Spithill TW, Smith RE, Raadsma HW. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunol* 2010; 32: 572-81.
2. Onder H, Ekici F, Adin E, Kuday S, Gümüş H, Bilici A. An incidental case of biliary fascioliasis with subtle clinical findings: US and MRCP findings. *Radiol Oncol* 2013; 47: 125-7. [CrossRef]
3. Dalimi A, Jabarvand M. *Fasciola hepatica* in the human eye. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99: 798-800. [CrossRef]
4. Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, Lamenza P, Solana H. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Vet Parasitol* 2013; 195: 118-21. [CrossRef]
5. Wilson RA, Wright JM, de Castro-Borges W, Parker-Manuel SJ, Dowle AA, Ashton PD, Young ND, Gasser RB, Spithill TW. Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *Int J Parasitol* 2011; 41: 1347-59. [CrossRef]
6. Haçarız O, Sayers G, Baykal AT. A proteomic approach to investigate the distribution and abundance of surface and internal *Fasciola hepatica* proteins during the chronic stage of natural liver fluke infection in cattle. *J Proteome Res* 2012; 11: 3592-604. [CrossRef]
7. Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8: 1891-907. [CrossRef]
8. Cervi L, Rubinstein H, Masih DT. Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Vet Parasitol* 1996; 61: 97-111. [CrossRef]
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54. [CrossRef]
10. Collins PR, Stack CM, O'Neill SM, Doyle S, Ryan T, Brennan GP, et al. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 17038-46. [CrossRef]
11. Jefferies JR, Campbell AM, van Rossum AJ, Barrett J, Brophy PM. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics* 2001; 1: 1128-32. [CrossRef]
12. Bennaars-Eiden A, Higgins L, Hertzell AV, Kappahn RJ, Ferrington DA, Bernlohr DA. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal *in Vitro* and *in Vivo*. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol Chem* 2002; 277: 50693-702. [CrossRef]
13. Bozas SE, Panaccio M, Creaney J, Dosen M, Parsons JC, Vlasuk GV, Walker ID, Spithill TW. Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 74: 19-29. [CrossRef]
14. Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun* 2005; 1: 166-73. [CrossRef]
15. Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 499-511. [CrossRef]
16. Haçarız O, Sayers G, Mulcahy G. A preliminary study to understand the effect of *Fasciola hepatica* tegument on naïve macrophages and humoral responses in an ovine model. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 139: 245-9. [CrossRef]
17. Flynn RJ, Mannion C, Golden O, Hacıoğlu O, Mulcahy G. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2007; 75: 1373-81. [CrossRef]
18. Piedrafita D, Parsons JC, Sandeman RM, Wood PR, Estuningsih SE, Partoutomo S, Spithill TW. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* *in vitro* is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunol* 2001; 23: 473-82. [CrossRef]