T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ulex europaeus LEKTİNİNİN İNSAN Rh (-) KAN GRUBU BAĞLANMA ÖZGÜLLÜĞÜ

NURCAN ŞAHİNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORTAÖĞRETİM FEN VE MATEMATİK ALANLAR EĞİTİMİ ANABİLİM DALI

Konya, 2008

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ulex europaeus LEKTİNİNİN İNSAN Rh(-) KAN GRUBU BAĞLANMA ÖZGÜLLÜĞÜ

NURCAN ŞAHİNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORTAÖĞRETİM FEN VE MATEMATİK ALANLAR EĞİTİMİ ANABİLİM DALI

BİYOLOJİ ÖĞRETMENLİĞİ PROGRAMI

KONYA, 2008

Bu tez 29.02.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Ali ATEŞ	Prof. Dr. Tuncer KORKMAZ	Prof. Dr. Yusuf DURAK
(Danışman)	(Üye)	(Üye)

ÖZET

Yüksek lisans tezi

Ulex europaeus LEKTİNİNİN KAN GRUBU BAĞLANMA ÖZGÜLLÜĞÜ

Nurcan ŞAHİNER

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Ortaöğretim Fen Ve Matematik Alanlar Eğitimi Anabilim Dalı

Biyoloji Öğretmenliği Programı

Danışman : Prof. Dr. Ali ATEŞ

2008, 40 sayfa

Jüri: Prof.Dr. Ali ATEŞ

Prof. Dr. Yusuf DURAK

Prof. Dr. Tuncer KORKMAZ

Bu çalışmada *Ulex europaeus* bitkisinden elde edilen *Ulex europaeus* aglutinin-I (UEA-I)'in Rh(-) insan kan grubu bağlama özgüllüğü araştırıldı. Bu deney için A Rh(-), B Rh(-), AB Rh(-) ve O Rh(-) kan grubu eritrositleri kullanıldı. Phosphate buffered saline (PBS) ile yıkanan eritrositlerin %3' lük süspansiyonları hazırlandı.

100 μg/ml lektin solüsyonu PBS ile hazırlanarak başlangıç konsantrasyonu olarak alındı ve UEA-I' in seri dilüsyonu ile Rh(-) insan kan grubu özgüllüğü belirlendi.Yapılan

hemaglutinasyon deneyinde UEA-I'in A Rh(-) insan kan grubu eritrositlerini 50 µg/ml konsantrasyonda, B Rh(-) kan grubu eritrositleirini 25 µg/ml konsantrasyonda, AB Rh(-) kan grubu eritrositlerini 50 µg/ml konsantrasyonda, O Rh(-) kan grubu eritrositlerini ise 6.25 µg/ml konsantrasyonda aglutine ettiği gözlenmiştir.

Bu konsantrasyonlara bakılarak, UEA- I'in O Rh(-) grubu insan kanı eritrositlerine karşı spesifik olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Ulex europaeus aglutinin – I, UEA-I, Hemaglutinasyon, Lektin

ABSTRACT

Ms Thesis

BLOOD GROUP BİNDİNG SPECİFİCİTY OF

THE LECTİN *Ulex europaeus*

Nurcan ŞAHİNER

Selçuk University Graduate School of

Natural and Applied Sciences

Department of Secondary Science and Mathematics Education

Biology Education

Supervisor : Prof.Dr. Ali ATEŞ

2008, 40 pages

Jury: Prof.Dr. Ali ATEŞ

Prof. Dr. Yusuf DURAK

Prof. Dr. Tuncer KORKMAZ

In this study, human Rh(-) blood group binding specificity of UEA-I lectin from *Ulex europaeus* was researched. For this experiment A Rh(-), B Rh (-), AB Rh(-) and O

Rh(-) blood group erytrocytes were used. %3 Erytrocytes solutions were prepared by using Phosphate buffered saline (PBS).

100 µg/ml lectin solution prepared with PBS was taken as a begining concentration and human blood group specificity of UEA-I was determined with the serial dilution of lectin.

Hemagglutination experiment was observed that the UEA-I agglutinated the %3 A Rh(-) group erythrocytes at the concentration of 50 µg/ml, B Rh(-) group erythrocytes at the concentration of 25 µg/ml, AB Rh(-) group erythrocytes at the concentration of 50 µg/ml and O Rh(-) group erytrocytes at the concentration of 6.25 µg/ml.

It was determined that UEA-I was specific for O Rh(-) human blood group erytrocytes .

Key Words: *Ulex europaeus* Agglutinin-I, UEA-I, Hemagglutination, Lectin

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanması sırasında, yardım ve desteğini hiçbir konuda esirgemeyen, her zaman yol gösterici olarak yanımda olan sayın hocam Prof. Dr. Ali ATEŞ'e, Meram Tıp Fakültesi Kan Bankası Şefi, Uzman Biolog Rahim KOCABAŞ' a ve Selçuk Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği bölümündeki tüm hocalarıma içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT iii

TEŞEKKÜR v

İÇİNDEKİLER vi

KISALTMALAR vii

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 3

3. MATERYAL ve METOD 15

3.1. PBS (Phosphate buffered saline) Hazırlanması. 15

3.2. Lektin Çözeltisinin Hazırlanması. 15

3.3. Eritrosit Süspansiyonu Hazırlanması 16

3.4 Hemaglutinasyon Aktivitesinin Tayini 17

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI 20

5. TARTIŞMA 26

6. KAYNAKLAR 29

KISALTMALAR

Caco-2	: Human colonic adenocarcinoma cells
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleikasit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
H	: Hücre
HIV-I	: Human Immunodeficiency Virüs
HPA	: Helix pomatia aglutinin
L	: Lektin
M	: Monosakkarit
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PL	: Poly Lisin
UEA-I	: Ulex europaeus aglutinin-I
UEA-II	: Ulex europaeus aglutinin-II
VAP	: Virus Attachment Protein
WGA	: Wheat Germ Aglutinin (Pisum sativum aglutinin)

1. GİRİŞ

Lektinler immün orijinli olmayan, hücreleri şeker bağlama özelliklerinden dolayı aglutine eden, en az iki şeker bağlama bölgesi ihtiva eden protein yada glikoprotein yapısında olan moleküllerdir. İlk önce bitkilerden izole edildiğinden bitkilere has moleküller olarak düşünülen lekinler, diğer canlılardan da elde edildikten sonra bu düşünceden vazgeçilmiştir (Goldstein ve ark. 1980).

Lektinler hücreleri aglutine etme ve glikokonjugatları prespite etme özelliklerine sahiptir. Daha önceleri Agglutinin, phytohemaaglutinin, phytoagglutinin ve prolektin gibi terimler de geçmişte lektin terimi yerine kullanılmıştır (Dixon 1981, Kocoürek 1986).

Lektinler spesifik karbonhidrat bağlama özelliklerinden faydalanılarak, karbonhidrat ve glikoprotein çalışmaları ile hızla gelişen araştırma sahalarında güçlü vasıtalar olarak kullanım alanı bulmaktadır (Ateş 1994).

Günümüzde lektinler, kanser hücrelerinin normal hücrelerden ayrılması ve kanser teşhisinde, habis hücrelerin yüzeylerindeki kimyasal değişikliklerin araştırılmasında, karbonhidrat içeren polimerlerin izolasyonu ve yapı çalışmalarında, hücre yüzeyi glikokonjugatlarının görevi, biyosentezi ve genetik çalışmaları gibi alanlarda kullanılmaktadır (Hawkes ve ark. 1982, Shibata ve ark 1982, Lis and Sharon 1986, Grillon 1991).

Lektinlerin yaygınca uygulama alanı bulduğu başka bir saha da kan gruplarının ayırt edilmesidir. *Lotus tetragonolobus* ve *Ulex europeus* lektinleri O grubu eritrositler için spesifiktir. Bu spesifiklik özellikle önemlidir çünkü doğal olarak O grubuna karşı anti-O antikoru mevcut bulunmamaktadır. Bundan başka *Vicia graminea*'den elde edilen lektin M ve N grup eritrositleri ayırt edebilmektedir. (Finne ve ark. 1982)

Bu çalışmada ise Ulex europaeus aglutinin-I'in Rh(-) insan kan grupları eritrositlerini aglutine etme aktivitesi araştırıldı. Bu çalışma sırasında *Ulex europaeus* bitkisinden elde edilen Ulex europaeus lektini kullanıldı. Buradaki amaç ise kan

grublarının ayrılmasında UEA-I lektininin alternatif bir araç olarak kullanılmasının uygunluğunun araştırılmasıdır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Lektinler üzerinde yapılan çalışmalar 19. Yüzyılın son yıllarında, 1888 ylında Estonyalı bir araştırmacı olan Hermann Stillmark'ın Dorpat Üniversitesinde doktora çalışmalarını sürdürdüğü bir farmakoloji enstitüsünde, *Ricinus comminus* bitkisinden elde edilen ekstratın eritrositler üzerine aglütine edici etkisini keşfetmesiyle başlamıştır. Stillmark çalışmaları sırasında aglutinasyona sebeb olan şeyin *Ricinus comminus* içeriğinde bulunan ricin maddesi olduğunu düşünmüştür (Lis and Sharon 1977).

Hücredeki özgül reseptörlere bağlanmaları ve insan kan grupları arasında seçim yapabilmelerinden esinlenerek, Latince seçmek veya seçim yaparak ayırmak anlamına gelen legere sözcüğünden türetilen lektin terimi, ilk kez 1954 yılında Boyd ve Shapleigh tarafından kullanıldı (Boyd 1963). 1981 yılında ise uluslararası Biyokimya Birliği Adlandırma Komitesi Goldstein'ın 1980 'deki önerisini esas alarak lektinleri; "Bağışıklık sisteminden kaynaklanmayan birden fazla şeker bağlama bölgesine sahip, hücreleri veya karbonhidrat içeren bileşikleri (glikoprotein vs.) kümeleştirerek çöktüren, protein ya da glikoprotein yapısındaki moleküller" tanımlaması ile ayrı bir biyokimyasal sınıfa yerleştirdi (Dixon 1981).

İlk olarak bitkilerden izole edildikleri için fitohemaglütininler adı verilmiş, daha sonra diğer canlı gruplarından da izole edildiklerinden genel olarak aglutininler denmiştir. Sonraları, hemaglutinin, fitoaglütinin ve prolektin gibi isimler kullanılmışsa da, günümüzde en çok lektin adı tercih edilmektedir (Goldstein ve Poretz 1986).

Son yıllardaki araştırmaların ışığında, yumuşakçalardan omurgalılara kadar olan geniş bir yelpazede yer aldıkları ve birçok biyolojik olayın şekillenmesinde rol oynadıkları açığa çıkarılmıştır. Evrim süreci içerisinde kaybolmadan varlıklarını sürdürmeleri, bunların önemli biyolojik rollerinin olduğu kanısını vermektedir. Fakat organizmada ne tür bir rol oynadıkları hala tartışmalıdır (Gabius 1997).

Lektinler yakın yüzyıla kadar bilinmesine rağmen son yirmi yada otuz yıl içerisinde ilgi odağı haline geldi. Bugün için lektinlerle ilgilenmenin pek çok sebebi vardır.

Bunlardan en önemlileri, hücre yüzeyinde ya da solüsyon içerisinde bulunan karbonhidratların keşfedilmelerinde ve yapısal çalışmalarında lektinlerin oldukça kullanışlı olmalarıdır. Buna ek olarak lektinlerin karbonhidratlarla olan etkileşimlerinin araştırılması, hem hücreler arasında hem de genelde bulunan karbonhidratlar ve proteinler arasındaki reaksiyonların büyük moleküler detaylarının araştırılmasında önemli bilgiler sağlar (Ateş ve Akın 1994).

Ayrıca lektinler; glikoproteinlerin ve glikopeptidlerin ayrılması ve karakterizasyonlarında, doku ve hücrelerin histokimyasal çalışmalarında, hücrelerin farklılaşmalarında, bakteri ve türlerinin belirlenmesinde, kemik iliği tranplantasyonu için kemik iliği hücrelerinin ve lenfositlerin fraksiyonunda, hastaların bağışıklık durumlarının saptanmasında, lenfositleri stimüle etmek ve hem lenfokininlerin üretimi hem de insan kan sitogenetiğinin kromozomal analizi için değerli bir araç olarak sitokimya alanında özellikle de hematoloji ve histokimya çalışamalarında geniş ölçüde uygulama alanı bulmuştur (Lapidot ve ark. 1990, Slifkin 1990, Grillon 1991, Danguy ve ark. 1998).

Lektinler immün kökenli olmayan ve en az iki şeker bağlama grubuna sahip protein veya glikoprotein molekülleri olup, hücreleri aglütine, glikokonjugatları prespite ederler, glikosidazlar, glikosilkinazlar ve toksinler birden çok şeker bağlama gruplarına sahip olsalar da lektin olarak göz önüne alınmazlar (Nomencl.com.Arch.1981). Genellikle glikoprotein yapısında olmalarına karşın, Karbonhidart içermeyen lektinlerin de varlığı, lektinlerin protein olmaları dışında ortak bir yapı özelliklerinin bulunmadığını düşündürmektedir (Lis and Sharon 1981a). Karbonhidrat içeren lektinlerin bu kısımlarında en çok hayvansal glikoproteinlerin yapılarına da giren mannoz, glukozamin, galaktozamin, N-asetilglukozamin ve N-asetilgalaktozamin bulunur. Daha az miktarda ise ksiloz, arabinoz ve fukoza rastlanmıştır (Sharon and Lis 1972).

Lektinlerin total aminoasit içeriklerinin % 30 kadarını aspartik asit, serin ve treonin oluşturmasına karşın, lektinler bitkisel proteinlerin bir özelliği olarak kükürtlü amino asitlerce fakirdirler veya bunları hiç içermezler (Lis and Sharon 1972, Lis and Sharon 1981a). Bunun yanında lektinler biyolojik aktiviteleri için Ca^{+2}, Mn^{+2} ve Mg^{+2} divalentlerini içerirler (Sharon and Lis 1990).

Lektinin ihtiva ettiği metal iyonları yüksek ısı ve proteolitik azalmaya karşı lektini korurlar (Blumberg and Tal 1976). Ayrıca bütün lektinlerin karbonhidratları bağlama aktiviteleri içerdikleri metal iyonlarına bağlıdır. Çünkü metal iyonları uzaklaştırıldıkları zaman lektinler karbonhidrat aktivitelerini kaybederler. Metal iyonlarının lektine bağlanmaları EDTA (Etillendiamintetraasetik asit) ile muameleleri sonucunda engellenir, çünkü EDTA katyonların yer değiştirmesini engellemektedir (Lis and Sharon 1981b).

Lektinler üzerine yapılan çalışmaların yoğunlaşmasıyla bu proteinleri diğer moleküllerden ayıran birçok özellik ortaya çıkmıştır. Barondes (1988) 'e göre lektinler enzim ve antikor özelliğinde olmayan moleküllerdir, bu tanımlama bütün araştırmacılar tarafından benimsenmiştir. Çünkü lektinlerin hücrelerdeki sentezi genler tarafından kontrol edilmekte ve herhangi bir antijen tarafından uyarılması sonucunda olmamaktadır.

Ayrıca, kendileri için spesifik karbonhidrat rezidülerine bağlanan bu proteinler, glikozidazlar ve glikoziltransferazların aksine bağlandıkları karbonhidrat yapılarını değiştirmediklerinden bu özellikleri ile enzimlerden farklılık gösterirler (Rüdiger ve Gabius 1993).

Hemen bütün lektinler glikoprotein özelliğinde olup, aralarında antikorların aksine yapısal bir benzerlik göstermezler. *Triticum vulgaris*'de (WGA) olduğu gibi 18 farklı polipeptit zincirinden oluşabildikleri gibi genelde 2 ile 4 üniteden oluşurlar ve kural olarak her bir ünite bir karbonhidrat rezidüsünü bağlama yeteneğine sahiptir. Karbonhidratlarla lektinler arasında oluşan bağlar kovalent özellikte olmayıp, zayıf nitelikli hidrojen köprüsü bağlardır (Lis and Sharon 1977, Rini 1995, Rüdiger 1997).

Dokuların şekillenmesinde hücrelerin aynı veya farklı türden oluşuna bakılmaksızın hücreler arası kontak kurulması ve iletişim esansiyeldir. Hücrelerin hemen hepsi membran yüzeylerindeki sialik asitin yarattığı negatif yükten dolayı birbirleriyle direkt ilişki içinde değil, glikokonjugatların yapısında bulunan birçok aracı molekül (lektinler, karbonhidratlar, laminin, integrin vs) üzerinden iletişimlerini sağlamaktadırlar (Wieser and Brunner 1982).

Hücrelerin birbirlerine karşı belli bir yatkınlık gösterdikleri uzun yıllardan beri bilinmektedir. Farklı renkteki bazı deniz süngerlerinin birbirinden ayırdıktan sonra sıvı bir

ortama bırakılan süngerlerin kısa bir süre içinde bir araya toplandıklarını gözlemlenmiştir (Wieser and Brunner 1982).

Özellikle 1950'li yılların ortalarından bu yana yapılan yoğun çalışmalar, hücreler arası var olan ilginin hücre yüzeylerinde lokalize olan moleküllerin bir sonucu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Lektinlerle glikokonjugatların karbonhidrat üniteleri arasında anahtar kilit prensibi esasına göre şekillenen karbonhidrat-protein etkileşimleri hücreler arası haberleşmede, sinyal transferinde, hücre içi protein transportunda, döllenmede, hücre farklılaşmasında, hücre adezyonunda, büyümenin kontrolünde, interferon ve sitokinin salgılanması gibi immunolojik olaylarda, makrofajların fagositoz için uyarılmasında, patolojik olaylarda hücrelerin transformasyonunda, metastazda, embriyogenezde, ekzostoz ve endostozda rol oynarlar (Sinowatz ve ark. 1984, Rastan ve ark. 1985, Bourrilon ve Aubery 1989, Fukuda 1991, Gabius 1997, Bresalier ve ark. 1998).

Günümüzde çok açık bir şekilde bilinmektedir ki, malignasi ve tümör ilerlemesi hücre membranında, N-asetilgalaktozamin ile galaktoz residülerinin sialisyonu ve asparagin- bağlı glikopeptidlerin normalden farklı olarak dallanması ile pozitif yönde ilgilidir (Dennis 1985).

Influenza virüsü (grip virüsü) solunum sistemindeki hücrelerin zarında bulunan mannoz'lara bağlanmaktadır. Influenza lektinlerinin por füzyonunun, hücre-hücre füzyonu olaylarının bireysel kinetikleri ile olduğu gözlenmiştir. Konakçı hücre mebranları ile influenza lektinlerinin bağlanması, düşük pH ortamında endozomlar ile başladığı, işaretleme yolu ile floresanlı mikroskopta gözlenmiştir (Renwrantz 1986).

Omurgasızlardaki lektinler, glikoproteinler ve glikolipitler ile interaksiyona girerek glikokonjugantları çöktürür veya hücreleri aglütine eder ve bunlar immunoglobulin olmayan proteinlerdir. Omurgasız lektinleri de omurgalı lektinleri gibi ya membrana bağlı olarak ya da çözünebilir halde organizmada bulunmaktadırlar. Soluble lektinlerin mukusta, yumurtada, bez hücrelerinde ve hemolenfde bulunduğu tespit edilmiştir (Veirbüchen 1991).

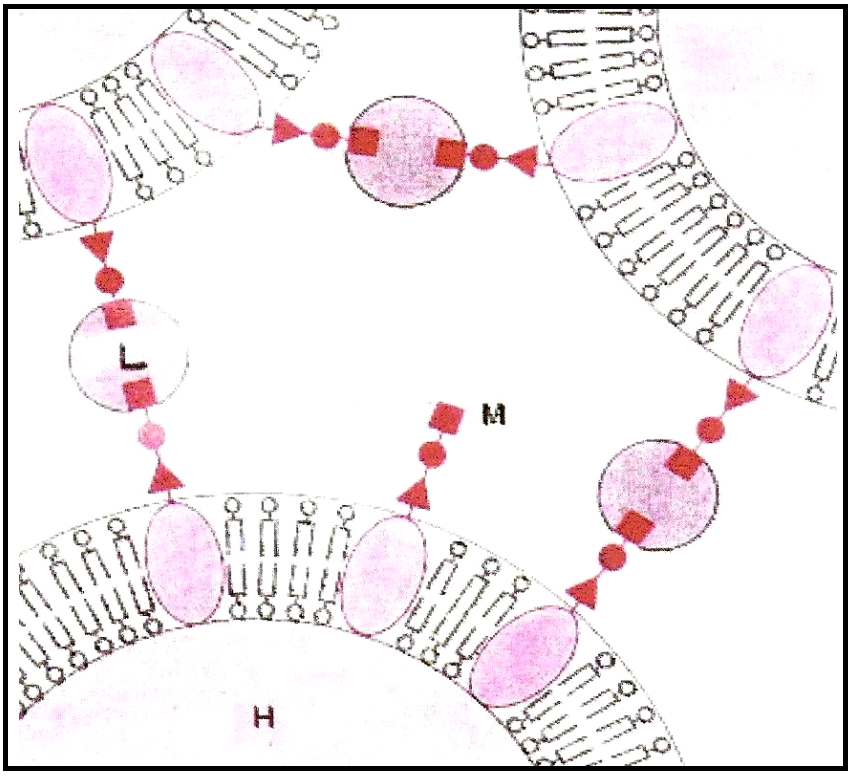
Renwrantz (1986)' a göre omurgasızlardan toprak kurdu *Helix pomatia* hemolenf lektininin diğer bazı yumuşakcalardan daha yüksek aglutinasyon aktivitesi gösterdiği ve insan A grubu eritrositlerini yüksek titre ile aglutine ettiği bildirilmiştir. Bu aglutinasyonun

da α bağlı N-asetilgalaktozamin tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir (Ateş ve Akın 1994).

Ayrıca *Helix pomatia* aglutinini (HPA) moleküler prob olarak göğüs kanserinde gelişen kanser hücrelerinin bulunmasında kullanılmaktadır (Brooks and Leathem 1995).

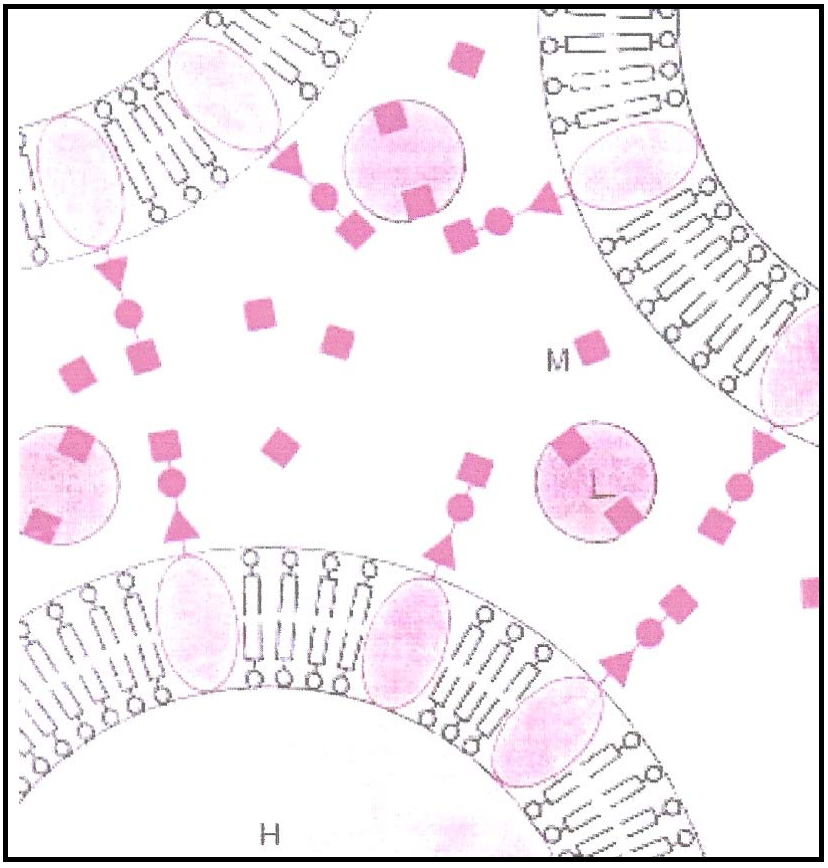
Böceklerin hemolenf lektinlerinin yapıları, molekül ağırlıklarının tespiti, hemaglutinasyon yetenekleri, karbonhidratlara bağlanma özellikleri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Böceklerin hemolenf molekül ağırlıklarının 70-1500 kDa arasında değiştiği ve 30 ile 40 kDa arasında değişen alt ünitelere sahip oldukları bildirilmektedir (Gillespie and Kanost 1997).

Kan hücrelerini (omurgalı eritrositlerini) bakterileri, bira mayalarını, parazitleri, virüsleri aglutine etmek, lektinlerin başlıca biyolojik etkileridir. Bu aglutinasyon olayında yabancı hücre yüzeyinde bulunan lektin reseptörlerine organizmada bulunan lektinler çapraz bağlarla bağlanarak yabancı hücreyi çöktürürler. (Şekil 2.1.) Böylece hücresel bağışıklık reaksiyonunu başlatmış olurlar. Lektinlerin spesifik karbonhidratlarla (mono, di ve oligosakkaritlerle) bağlanma yaptıkları bilinmektedir (Sharon 1977, Lis and Sharon 1986, Olafsen 1986, Vierbüchen 1991).



Şekil 2.1. Lektinin hücre yüzeyinde bulunan şeker ünitelerine (spesifik reseptörlerine) çapraz bağlanması ile oluşturduğu aglutinasyon şeması (Sharon 1977). L: Lektin, H: Hücre, M: Monosakkarit.

Lektinlerin yabancı materyali aglutinasyonunun çeşitli karbonhidratlar tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (Şekil 2.2). Lektin reseptörlerinin yapılarını aydınlatmak için inhibisyon olayından faydalanılır. Bu inhibisyon olayında, lektine özgü şeker ortama ilave edildiğinde lektine hızla bağlanır. Böylece lektin yabancı mateyalin yüzeyindeki lektin reseptörlerine bağlanamayacağı için aglutinasyon inhibe edilmiş olur. Lektinlerin şekerlerle olan bu bağlantılarının antijen-antikor veya enzim-substrat bağlantısına benzediği bildirilmiştir (Nichols and Nakamura 1986, Pendland ve ark. 1988, Mc Kenzie and Preston 1992 a,b).



Şekil 2.2. Lektinin bağlanma bölgesine ortamda bulunabilen monosakkritlerin bağlanması ile aglutinasyonun inhibe edilmesi (Sharon 1977).

L: Lektin, H: Hücre, M: Monosakkarit.

Lektinlerin spesifik olduğu şekerin ilave edilmesi ile lektin bağlanmasının çözülebilmesi, lektinlerin hücrelerin tanınmasında ve hücre subpopulasyonlarının ayrıştırılmasında kullanılmasına imkan vermiştir, yer fıstığı aglutinini kullanarak, farelerde prelösemik hücreleri genç devre lösemik hücrelerden ayırt etmişlerdir (Reisner ve ark.1980).

Extatosoma tiaratum (Phasmida) hemolenfinden D-galaktoz'a spesifik lektini affinite kromatografisini ve jel filtrasyonu yöntemi ile saflaştırılmış, 71 000–76 000 Da moleküler ağırlığında olan lektinin non-kovalent bağla bağlanan 12 000–14 000 Da molekül ağırlığında altı adet alt üniteye sahip olduğu gözlenmiştir. *Extatosoma tiaratum* serum lektini A, B, O grubu insan kanı eritrositlerini 1/32 titre ile, at kanı eritrositlerini

1/64 titre ile sığır kanı eritrositlerini 1/32 titre ile, koyun kanı eritrositlerini1/16 titre ile tavuk kanı eritrositlerini ¼ titre ile aglutine ettiği, ayrıca *Extatosoma tiaratum* lektininin Ca^{+2} iyonlarının varlığında tavşan kanı eritrositlerini aglutine ederken, böceğin hemositlerinden granüllü hücrelerin (%58' i) ve plasmatositlerin (%11' i) tavşan kanı eritrositlerinin etrafında roset şeklini oluşturdukları gözlenmiştir (Richards and Ractliffe 1990).

Wang ve arkadaşları (2005), *Ulex europaeus* – I lektinini HIV-I zarfına karşı hedeflenmiş hücre bağışıklığı için gen transferinde kullanmışlardır. DNA' ları özel dokulara hedeflemede reseptör aracılığıyla DNA transfeksiyonunun çok verimli bir metod olduğu rapor edilmiştir. M hücrelerine alternatif olarak *Ulex europaeus*-I lektini test edilmiştir. UEA-I'in insan bağırsak sistemindeki caco-2 hücrelerine bağlandığı ve UEA-I ile konjuge olmuş poly-L lisin (PL) ile bu hücrelere DNA transfeksiyonu yapıldığı rapor edilmiştir. Bu UEA-I aracılığıyla yapılan transferin HIV-I virüsüne karşı hücresel ve humoral bağışıklığın başlaması için alternatif bir formül olduğu bildirilmiştir.

Hamashin ve arkadaşları (2003), tarafından hedeflenmiş ilaç iletiminde UEA-I lektini yerine kimyasal olarak laboratuvar şartlarında üretilen UEA-I taklitçileri kullanılmış ve α-L fukoz şekerine spesifik olan UEA-I lektininin taklitçisi olan molekülün α-L fukoza daha yüksek oranda bağlandığı tespit edilmiştir.

Büyük baş hayvanlardaki Trichomonas hastalığı, vücudun diğer bölgelerinde yayılış göstermeyen bir protozoa olan *Trichomonas foetus* tarafından yapılan zührevi bir enfeksiyonlu hastalıktır. Bu flagellat türü üreme organları dokusunda kolonileşerek kısırlığa sebeb olur. Monteavara ve arkadaşları (2007), yaptıkları çalışmada T.foetus ile enfekte ettikleri dişi farelerde üreme organlarındaki değişikliğin immünohistokimyasal yapısını araştırmışlardır. Histokimyasal olarak üretken doku içerisindeki karbonhidrat değişikliğini belirlemek için lektinleri kullanmışlardır. Bu değişikliklerden ilkini UEA-I'in vajina dokusu hücrelerini bağlama gücünün artışıyla aşılamadan 16 gün sonra tespit etmişlerdir. Kontrol gruplarındaki farelerin vajina dokuları ise UEA-I lektini ile reaksiyon vermemiştir. Buradan T. foetus ile enfekte olmuş dokuların hücre yüzeylerinin karbonhidrat bileşimlerinin değiştiği sonucuna varılmıştır.

Zhang ve arkadaşaları (2005), amacı lektinlerle bağlanmış insülin içeren lipozomları düzenlemek ve bu modifiye edilmiş kolloidal taşıyıcıların, peptit ve protein yapılı ilaçların ağızdan alınımının potansiyellerini değerlendirmek olan bir çalışma yapmışlardır. Oral uygulamalarda taşıyıcı olarak lektinle bağlanmış insülin liposomlarının araştırılması sonucu lektinle bağlanmış liposomların oral yoldan insülin emilimini gastrointestinal hücre membranındaki özel bölge kombinasyonları nedeniyle desteklediğini ortaya koymuştur. Gastrointestinal hücre membranlarında glikozlarla bağ yapmış birçok protein ve lipit olduğunu, bu glikanların lektinlerle bağlanma bölgelerine sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Bu glikanların N-asetilgalaktozamin, N-asetilglukozamin, galaktoz, fukoz ve sialik asit gibi karbonhidratları kapsadığı bildirilmiştir.

Affinite kromatografisi ile UEA-I'in kantitatif olarak izolasyonundaki kolaylık normal ve hastalıklı dokuların gelişmesi esnasında hücre yüzeylerinin biyolojik ve biyokimyasal çalışmaları için bu lektinin kullanılmasını teşvik etmiştir. Temelde kan grubuna özgü olan lektinler A grubundaki N-asetilgalaktozamin, B grubundaki α-galaktoz ve O grubundaki α-fukoz artıklarını tanırken aynı zamanda saflaştırılan lektinlerle ve yapısal olarak karakterize edilen oligosakkaritler ile yapılan birçok deneyde lektinlerin sadece monosakkarit kalıntıları değil aynı zamanda daha kompleks şeker zincirlerini de tanıdıkları gösterilmiştir (Yamamoto ve ark. 1998).

Matsui ve arkadaşları (2001), ABO kan grubu antijenleri üzerindeki kompleks yapılı oligosakkaritler ve glikoproteinlere karşı kan gruplarını tanıyan lektinleri karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Sonuçta HPA (*Helix pomatia* aglutinin) ve UEA-I (*ulex europaeus* aglutinin)' in sırasıyla A ve O kan grubu antijenlerinin çok az miktarlarındaki glikoproteinlerin bulunmasında bile çok duyarlı, ve bu antijenleri içeren kompleks yapıdaki oligosakkaritlerin kısımlara ayrılmasında da çok faydalı oldukları tespit edilmiştir.

Lektinlerin meydana gelişleri, fonksiyonları ve fizikokimyasal özelliklerine göre iki ana gruba ayrılabileceği bildirilmiştir (Vierbüchen 1991). Bu bildiriye göre lektinler soluble lektinler ve membran lektinleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Soluble lektinlerin salgılanma aktivitesinde ve ekstrasellüler matriksin organizasyonunda rol oynayabileceği bildirilmiştir. Membran lektinleri ise önemli biyolojik aktivitelerde örneğin, hücre- hücre

interaksiyonunda, hücre-hücre tanınmasında ve hücre adezyonunda rol alabileceği öne sürülmüştür (Sharon 1977).

Membran lektinleri çeşitli hayvanların ve insanların hemen hemen bütün organlarında (karaciğer, mide, böbrek, beyin, dalak, timus, akciğer) bulunmaktadır. Soluble lektinler organların sulu ekstratlarından elde edilmiştir (Lis and Sharon 1986). Soluble lektinler β-galaktosidazlar ile reaksiyona girmektedirler ve ortak olarak dimerik yapıya sahiptirler.

Membran lektinlerinin ise fizikokimyasal özellikleri ve şekerlerle olan bağlantıları farklıdır. Örneğin memeli ve kuşlarda bulunan lektinler galaktoz ve mannoz / N-asetilglukozamin ile bağlantı kurarlar. Oysa ki yavru hamster'in böbrek hücrelerindeki mikrozomal fraksiyonlardan izole edilen endojen orjinli lektinin tiyodigalaktosid ve n-asetilgalaktozamin ile bağlandığı gözlenmiştir (Lis and Sharon 1986).

Horejsi ve Kocoürek (1974) tarafından *Ulex europaeus* bitkisinin totum ekstratında bulunan lektin elde edilerek karakterize edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi ve affinite kromatografisi kullanarak aktif maddenin 40 000- 46 000 dalton molekül ağırlıkta olduğu ve % 7.2 oranında karbonhidrat ihtiva ettiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan *Ulex europaeus* bitkisi Fabaceae familyasının türlerinden biridir. Herdem yeşil yaprak dökmeyen çalılık şeklinde bir bitkidir. Genellikle 1-2 m boya sahip olan bu bitki 3 metreye kadar uzayabilir. Çiçekleri sarıdır ve 1-3 cm uzunluğunda, tipik bezelye çiçeğine benzer bir yapıdadır. Özellikle baharın erken dönemleri olmak üzere yıl boyu çiçek üretirler. Bozulmuş alanlarda, kum tepelerinde, tarlalarda meralarda yanmış alanlarda genellikle kışı ılıman ve nemli geçen yerlerde yayılış gösterirken, soğuk kış şartlarında ya da kurak iklimlerde hayatta kalamaz. İyi yıkanmış nötr veya orta derecede asit içeren (pH 4.5-5.0) topraklarda en iyi şekilde yetişir ve serpentinli topraklara toleranslıdır. Sık çalı şeklinde olduğundan yangın çıkma tehlikesini arttırır fakat yangından sonra köklerden tekrar gelişebilir. Nadir de olsa yüksek miktarda kalsiyum içeren topraklarda da yetişmektedir. Köklerinde nitrojeni fiske eden bakteriler yaşar (Wagner ve arkadaşları 1999).

Avrupanın batısından, büyük Britanyanın kuzey uçlarına kadar, Güneyde Portekiz ve İrlandanın batı uçlarına kadar yayılım gösterir (en.wikipedia.org internet sitesi).

Ulex europaeus aglutininin 63 000 dalton molekül ağırlıkta bir glikoprotein olduğunu ve bu glikoproteinin 31 000 ve 32 000 dalton molekül ağırlıkta iki alt üniteden meydana geldiği rapor edilmiştir. *Ulex europaeus* bitki tohumlarından amonyum sülfat ile fraksiyonlu çöktürme metodu ile insan kanı eritrositlerini aglutine edebilen *Ulex europaeus* aglutinin-I (UEA-I) ve *Ulex europaeus* aglutinin-II (UEA-II) olarak adlandırılan iki lektin saflaştırılmıştır (Frost ve arkadaşları 1975).

Ulex europaeus I fitohemaglutinini ile insan kan grupları arasındaki ilişki çalışılmış ve UEA-I'in insan kanı O grubu eritrositlerini, B grubu eritrositlerini ve A_2 alt grubu eritrositlerini aglutine ettiği gibi domuz, inek, ve at kanlarını da çöktürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca UEA-I'in insan A_1 alt grubu eritrositlerini ise oldukça yüksek doz kullanıldığı zaman aglutine ettiği tespit edilmiştir (Lis and Sharon 1972, Race and Sanger 1975, Pereira ve arkadaşları 1978, Finne and Krusıus 1982).

Lektin reseptörlerinin yapılarını aydınlatmak için ilk olarak değişik şekerlerle inhibisyon deneyleri yapılır. Bu inhibisyon deneylerinde, lektine özgü şeker ortama ilave edildiğinde lektine hızla bağlanır. Böylece lektin yabancı hücre yüzeyindeki özgül reseptörünün şekerine bağlanamayacağı için aglutinasyon inhibe edilmiş olur. Ayrıca karbonhidratların lektindeki reseptörlerine bağlanması ile uygulanan bu metot lektinlerin hücre yüzeyinde bağlantı yaptıkları özgün şekerlerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Sharon 1977).

Preira ve arkadaşları (1978) Ulex europaeus aglutinin-I ve II'nin karbonhidrat bağlama spesifikliğini araştırdılar. Araştırıcılar UEA-I fitohemaglutininin en etkili inhibitörünün L-fukoz , α 1-2 D-galaktoz, β 1-4 D-asetilglukozamin, β1 yapısına sahip oligosakkrit olduğu ayrıca aglutinin 2-fukozillaktoz ve laktodifukotetroz ile de inhibe edildiğini ve UEA-II fitohemaglutininin inhibisyonunun da en etkili olarak N,N'-diasetilsitobioz tarafından gerçekleştirildiğini belirlediler.

Ulex europaeus-I lektininin amino asit analizi yapıldığında yüksek oranda aspartik asit, serin ve glisin, düşük oranda ise sistein, triptofan ve metionin olduğu rapor edilmiştir (Horojesi and Kocoürek 1974).



Şekil 2.3. *Ulex europaeus* bitkisi (Sloth 2003).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. PBS (Phosphate buffered saline) Hazırlanması.

İnsan kanı eritrositlerinin ve lektin çözeltisinin hazırlanmasında PBS kullanılmıştır (Lackie 1981). PBS çözeltisinin hazırlanmasında gerekli kimyasal maddeler Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Anabilim Dalı laboratuvarından temin edildi.

8.0 g NaCl

0.2 g KCl

0.2 g KH_2PO4

1.15 g Na_2HPO4

hassas terazide tartıldıktan sonra bir miktar double distile su ile balon joje içerisinde, manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü, daha sonra çözelti hacmi double distile su ile 1000 ml' ye tamamlanarak çözeltinin pH' ı 7.3' e ayarlandı.

3.2. Lektin Çözeltisinin Hazırlanması.

Lektin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan lektin *Ulex europaeus* aglutinin-I (UEA –I), (Lot E 5505) Sigma Chemical Company St Louis/ USA' dan satın alınmıştır. *Ulex europaeus* I lektini hassas terazide 2 mg olarak tartıldı. Daha önce hazırlanmış olan

PBS çözeltisinden 2 ml alınarak tartılan 2 mg UEA-I manyetik karıştırıcı ile iyice çözüldü. Böylece 1 mg/ml oranında UEA-I lektin çözeltisi elde edildi.Bu çözelti daha sonra kullanılmak üzere 4 ayrı Eppendorf tüpüne bölünerek -20 °C' de dondurulup saklandı.

3.3. Eritrosit Süspansiyonu Hazırlanması

Hemaglutinasyon deneyleri için her kan grubunun % 3' lük eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Kullanılacak olan A Rh (-), B Rh (-), O Rh (-) ve AB Rh (-) kan grupları Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezinden taze olarak temin edildi.

Eritrosit süspansiyonları Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji öğretmenliği laboratuvarında hazırlandı. %3' lük eritrosit süspansiyonlarının hazırlanmasında anti-A, anti-B ve Rh faktör serumları kullanılarak A Rh (-), B Rh (-), AB Rh (-) ve O Rh (-) kan grupları tespit edildi. Kanlar heparinli tüplere alındı. İlk olarak tüpler 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Eritrositlerin parçalanmaması için santrifüj devri 2000 rpm olarak ayarlandı. Santrifüjden sonra üst kısımda toplanan süpernatant dipteki hücreli kısım haraketlendirilmeden otomatik pipet yardımıyla alınıp atıldı.

Eritrositleri yıkamak için her tüpün üstüne eritrositlerin 3 katı kadar PBS çözeltisi konup eritrositlerin ve PBS' in karışması için ağızları parafin ile kapatılarak ters düz edildi. Daha sonra tekrar santrifüj aletinde 5 dk 2000 rpm' de santrifüj edilen tüplerin üzerinde biriken sıvı otomatik pipet yardımıyla alındı. Bu işlem sırasında eritrositlerin hareketlendirilmemesine dikkat edildi. Tüplerin üzerine tekrar hacimlerinin 3 katı kadar PBS kondu ve tekrar karışması için alt üst edildi, tekrar santrifüj aletinde santrifüj edildi, daha sonra üzerlerindeki sıvı kısım alındı ve atıldı. Bu yıkama işlemine eritrositlerin üzerinde biriken sarı sıvı renksiz saydam bir hal alana kadar devam edildi.

Toplam dört yıkama sonunda üst yüzeyde renksiz saydam sıvının toplandığı görüldü, en son olarak bu sıvılar da otomatik pipetle alınıp atıldı. Otomatik pipetle tüplerin üst yüzeyinden alamadığımız çok az miktardaki saydam sıvı eritrositlerle karıştırıldı. Böylece eritrosit yıkama işlemi tamamlanmış oldu. 10×75 mm boyutlarında 4 adet tüp alındı ve bu tüpler A Rh(-), B Rh (-), AB Rh (-) ve O Rh (-) olmak üzere isimlendirildi.

Daha sonra her kan grubunun eritrosit süspansiyonun hazırlanması için her kan grubu eritrositlerinden otomatik pipet yardımı ile 60' ar µl eritrosit alındı ve her kan grubu eritrositi kendisi için isimlendirilmiş olan 10×75 mm boyutlarındaki tüplere kondu. Üzerine PBS çözeltisi eklendi böylece her kan grubu için %3'lük 2000 µl eritrosit süspansiyonu hazırlanmış olduk.

3.4 Hemaglutinasyon Aktivitesinin Tayini

Hemaglutinasyon çalışmaları Frost (1975) ve Castro *et al* (1987)'a göre yapılmıştır. Ulex europaeus aglutinin-I'in hemaglutinasyon aktivitesinin tayini in vitro olarak 96 kuyucuklu U tabanlı mikrotitrasyon kabı içerisinde gerçekleştirildi.

Hemaglutinasyon tayini yapılırken 100 µl' lik ve 1000 µl 'lik eppendorf marka iki adet otomatik pipetler kullanıldı.

Hemaglutinasyon aktivitesinin tayini için 100 µg/ml'lik lektin çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözeltiyi elde etmek için, önceden 1mg/ml yoğunlukta hazırladığımız lektin çözeltisinden otomatik pipet yardımıyla 100 µl kadar alınıp ayrı bir tüpe kondu, daha sonra üzerine otomatik pipet yardımıyla 900 µl PBS çözeltisi eklendi. Tüpün içerisindeki çözelti iyice karıştırıldıktan sonra 100 µg/ml'lik lektin çözeltisi elde edilmiş oldu. Bu çözelti hemaglutinasyon aktivitesinin tayini için kullanıldı.

Hemaglutinasyon aktivitesinin tayini için mikrotitrasyon kabının A_1, C_1, E_1, G_1 kuyucuklarına hazırladığımız 100 µg/ml'lik lektin çözeltisinden 50'şer µl kondu. Daha

sonra dilüsyon yapmak için A_2-A_{12}, C_2-C_{12}, E_2-E_{12} ve G_2-G_{12} kuyucuklarına 25'er µl PBS çözeltisi kondu.

Daha sonra dilüsyon yapmak için A_1, C_1, E_1, G_1 kuyucuklarından 25'er µl lektin çözeltisi alınıp A_2, C_2, E_2, G_2 kuyucuklarına ilave edildi. Bu kuyucuklarda lektin ve PBS çözeltisinin karışması için otomatik pipetle birkaç kez çekip bırakıldı, böylece lektin ve PBS çözeltisinin karışması sağlandı. Daha sonra seri dilüsyona devam edildi. Bunun için A_2, C_2, E_2, G_2 kuyucuklarından 25'er µl lektin PBS karışımı alınıp A_3, C_3, E_3, G_3 kuyucuklarına bırakıldı, yine otomatik pipetle çekilip bırakılarak karışması sağlandı. Bu işleme A_{12}, C_{12}, E_{12} ve G_{12} kuyucuklarına kadar devam edildi, son kuyucuklardan alınan 25'er µl lektin-PBS karışımı dışarı atıldı.

Böylece seri dilüsyon yapılmış oldu her kuyucukta azalan bir lektin konsantrasyonu oluşturuldu. Ayrıca her kuyucukta eşit hacimde karışım bulunmuş oldu.

100 µg/ml' lik yoğunluğa sahip lektin çözeltisinin seri dilüsyonu tamamlandıktan sonra hemaglutinasyon aktivitesinin tayini için hazırlanmış olan eritrosit süspansiyonları kuyucuklara ilave edildi. Bunun için ilk olarak A_1 kuyucuğundan A_{12} kuyucuğuna kadar her kuyucuğa 25'er µl %3'lük A Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu ilave edildi. Daha sonra C_1 Kuyucuğundan C_{12} kuyucuğuna kadar her kuyucuğa 25'er µl %3'lük B Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu ilave edildi. E_1 kuyucuğundan E_{12} kuyucuğuna kadar her kuyucuğa 25'er µl %3'lük AB Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu ve son olarak da G_1 kuyucuğunda G_{12} kuyucuğuna kadar her kuyucuğa 25'er µl %3'lük O Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu ilave edildi.

Kan gruplarının aglutinasyon aktivitesinin ölçümünü kontrol için her kuyucuğun altındaki kuyucuklar kontrol grubu olarak hazırlandı. Bunun için A Rh (-) kan grubunun hemaglutinasyon aktivitesinin kontrolü için B_1 kuyucuğundan B_4 kuyucuğuna kadar 25'er µl PBS + 25'er µl A Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu ile birlikte, B_5-B_8 kuyucuklarına 50'şer µl A Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu ve B_9-B_{12} kuyucuklarına 50'şer µl PBS solüsyonu kondu.

B Rh (-) kan grubunun hemaglutinasyon aktivitesinin tayini için D_1-D_4 kuyucuklarına 25'er µl PBS + 25'er µl B Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu beraber,

D_5-D_8 kuyucuklarına 50'şer µl B Rh(-) kan grubu eritrosit süspansiyonu kondu. D_9-D_{12} kuyucuklarına 50'şer µl PBS çözeltisi kondu.

AB Rh (-) kan grubunun kontrolü için F_1-F_4 kuyucuklarına 25'er µl PBS + 25'er µl AB Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu beraber, F_5-F_8 kuyucuklarına 50'şer µl AB Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu, F_9-F_{12} kuyucuklarına 50'şer µl PBS çözeltisi kondu.

O Rh (-) kan grubunun kontrolü için H_1-H_4 kuyucuklarına 25'er µl PBS ve 25'er µl O Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu beraber, H_5-H_8 kuyucuklarına 50'şer µl O Rh (-) kan grubu eritrosit süspansiyonu, H_9-H_{12} kuyucuklarına 50'şer µl PBS solüsyonu konuldu.

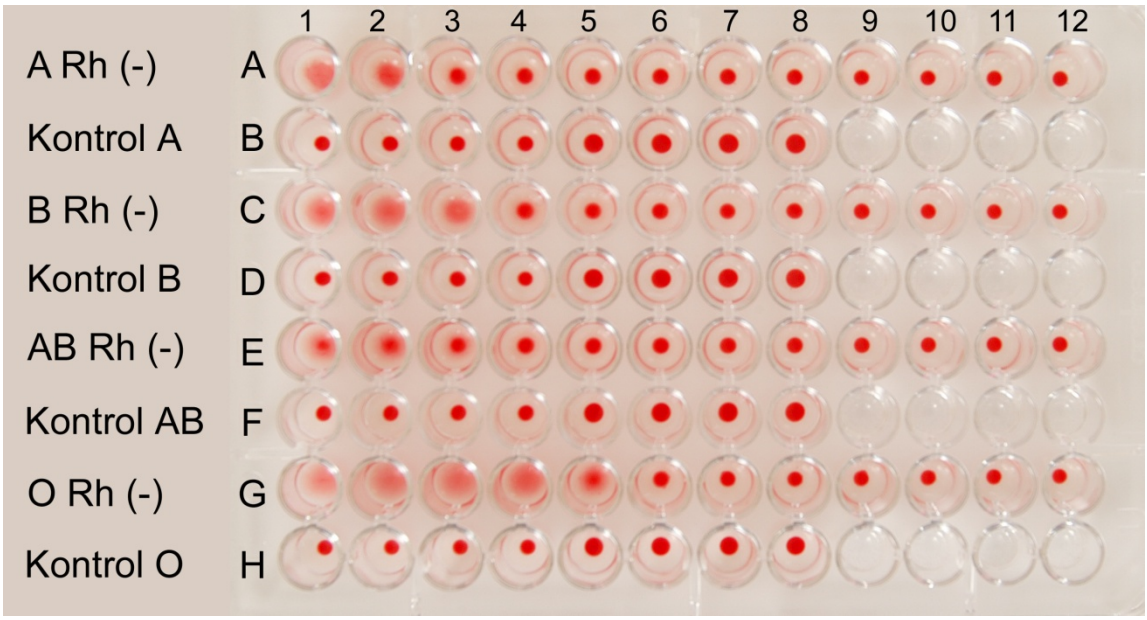
Bu işlemler tamamlandıktan sonra mikrotitrasyon kabı içine konulan tüm solüsyonların karışması için ileri geri birkaç kez sallandıktan sonra inkübasyon için bir saat beklendi ve sonuçlar kaydedildi.

Lektin tarafından aglütine olan ve olmayan hücrelerin mikroskop altında fotoğraflarının çekilmesi için aglütinasyonun en güçlü gözlendiği kan grubundan (O grubu) %5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan bu süspansiyondan iki ayrı temiz lama birer damla damlatıldı. Lamlardan bir tanesinin üzerine bir damla PBS diğerinin üzerine de bir damla 100 µg/ml'lik lektin çözeltisi damlatıldı. Her iki lamın üzerine temiz birer lamel kapatılarak oda sıcaklığında bir saat beklendi.

Daha sonra mikroskop altında incelenip preparatların fotoğrafları çekildi. Bu işlem de Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği laboratuvarında gerçeklerştirildi. UEA-I'in eritrositler ile hemaglutinasyon fotoğrafları çekilirken %5'lik eritrosit süspansiyonunun hazırlanmasının nedeni %3'lük eritrosit süspansiyonunda hücrelerin seyrek olarak bulunmasıdır. Böylece aglutinasyon sırasında hücrelerin yoğunluğu daha iyi gözlemlenmiş oldu. Fotoğraf çekimi için aglütinasyonun en iyi gözlemlendiği O Rh (-) kan grubu kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

Ulex europaeus bitkisinden elde edilen UEA-I lektininin in vitro ortamda A Rh (-), B Rh (-), AB Rh(-) ve O Rh (-) insan kanı eritrositlerini aglutine etme aktivitesi araştırılmış ve sonuçlar 96 kuyucuklu U tabanlı mikrotitrasyon kabında gösterilmiştir.



Şekil 4.1. UEA-I' in % 3'lük insan kanı A Rh (-), B Rh(-), AB Rh(-) ve O Rh(-) kan grup eritrositlerinin aglütinasyonu.

Mikrotitrasyon kabı kuyucuklarındaki eritrositlerin dağılması çökelme olduğunu, bir nokta halinda kalması ise çökelmenin olmadığını göstermektedir.

Buna göre UEA-I'in % 3'lük A Rh (-) kan grubu eritrositlerinin aglutinasyonu A_1 kuyucuğundan A_{12} kuyucuğuna kadar incelendiğinde ilk 2 kuyucukta yani A_1 ve A_2 kuyucuklarında çökelme gözlenmiştir. Çökelme sonuçlarına bakarsak A Rh (-) insan kanı

eritrositlerinin UEA-I tarafından aglutine edilmesi için gerekli en düşük dozun 50 µg/ml olduğu anlaşılmıştır.

%3'lük B Rh (-) kan grubu eritrositlerinin aglutinasyonu C_1 kuyucuğundan C_{12} kuyucuğuna kadar incelendiğinde, mikrotitrasyon kabının C_1, C_2 ve C_3 kuyucuklarında çökelme görülmüştür. C_4 den C_{12}'ye kadar olan kuyucuklarda ise çökelme görülmemiştir. Buna göre B Rh (-) kan grubu eritrositlerini aglutine etmek için gerekli olan en düşük UEA-I dozunun 25 µg /ml olduğu görülmüştür.

%3'lük AB Rh (-) kan grubu eritrositlerinin aglutinasyonu için minimum hemaglutinin dozunun 50 µg /ml olduğu sonucuna varılmıştır.

UEA-I'in %3'lük O Rh (-) kan grubu eritrositlerini aglutinasyonu G_1 kuyucuğundan G_{12} kuyucuğuna kadar incelendiğinde ilk 5 kuyucukta yani G_1'den G_5'e kadar olan kuyucuklarda aglutinasyonun gerçekleştiği, G7 den G12'ye kadar olan kuyucuklarda ise aglutinasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Buna göre UEA-I'in O Rh (-) kan grubu eritrositlerini aglutine etmesi için gerekli olan minimum dozun 6,25 µg/ml olduğu belirlendi.

Hemaglutinasyon aktivitesinin gözlenmesi sırasında aglutinasyonu meydana getiren etkenin UEA-I mi, eritrosit süspansiyonu içindeki herhangi başka bir madde mi ya da PBS'den mi kaynaklandığını görmek için hazırlanan kontrol gruplarında deney sırasında ve sonrasında herhangi bir değişim meydana gelmemiştir.

Kan gruplarının kontrolü yapılırken her kan grubunun altındaki kuyucuklar kontrol grubu olarak hazırlandı. Sonuç olarak ise hazırlanan kontrol grublarında herhangi bir değişim gözlenmedi. Bundan dolayı aglutinasyonu meydana getiren faktörün UEA-I lektini olduğu kanıtlanmış oldu.

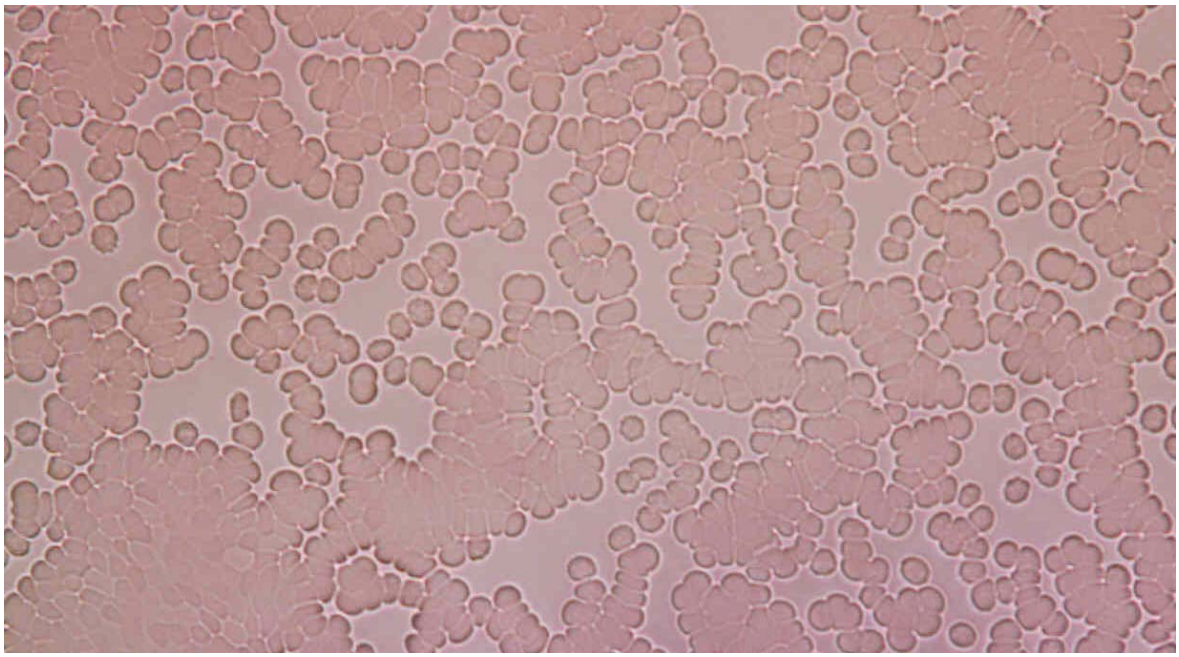
Tablo 4.1. Lektinin seri dilüsyonu sonucu mikrotitrasyon kabının A, C, E ve G sıralarındaki her kuyucukta bulunan lektin miktarı (µg/ml)

KAN GRUPLARI		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A Rh (-)	A	100 µg/ml	* 50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	3,13 µg/ml	1,57 µg/ml	0,79 µg/ml	0,40 µg/ml	0,20 µg/ml	0,10 µg/ml	0,05 µg/ml
KONTROL A Rh (-)	B	25 µl PBS+25 µl A Rh(-)	25 µl PBS+25 µl A Rh(-)	25 µl PBS+25 µl A Rh(-)	25 µl PBS+25 µl A Rh(-)	50 µl A Rh(-)	50 µl A Rh(-)	50 µl A Rh(-)	50 µl A Rh(-)	50 µl PBS	50 µl PBS	50 µl PBS	50 µl PBS
B Rh (-)	C	100 µg/ml	50 µg/ml	* 25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	3,13 µg/ml	1,57 µg/ml	0,79 µg/ml	0,40 µg/ml	0,20 µg/ml	0,10 µg/ml	0,05 µg/ml
KONTROL B Rh (-)	D	25 µl PBS+25 µl B Rh(-)	25 µl PBS+25 µl B Rh(-)	25 µl PBS+25 µl B Rh(-)	25 µl PBS+25 µl B Rh(-)	50 µl B Rh(-)	50 µl B Rh(-)	50 µl B Rh(-)	50 µl B Rh(-)	50 µl PBS	50 µl PBS	50 µl PBS	50 µl PBS
AB Rh (-)	E	100 µg/ml	* 50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	3,13 µg/ml	1,57 µg/ml	0,79 µg/ml	0,40 µg/ml	0,20 µg/ml	0,10 µg/ml	0,05 µg/ml
KONTROL AB Rh (-)	F	25 µl PBS+25 µl AB Rh(-)	25 µl PBS+25 µl AB Rh(-)	25 µl PBS+25 µl AB Rh(-)	25 µl PBS+25 µl AB Rh(-)	50 µl AB Rh(-)	50 µl AB Rh(-)	50 µl AB Rh(-)	50 µl AB Rh(-)	50 µl PBS	50 µl PBS	50 µl PBS	50 µl PBS
O Rh (-)	G	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	* 6,25 µg/ml	3,13 µg/ml	1,57 µg/ml	0,79 µg/ml	0,40 µg/ml	0,20 µg/ml	0,10 µg/ml	0,05 µg/ml
KONTROL O Rh (-)	H	25 µl PBS+25 µl O Rh(-)	25 µl PBS+25 µl O Rh(-)	25 µl PBS+25 µl O Rh(-)	25 µl PBS+25 µl O Rh(-)	50 µl O Rh(-)	50 µl O Rh(-)	50 µl O Rh(-)	50 µl O Rh(-)	50 µl PBS	50 µl PBS	50 µl PBS	50 µl PBS

* UEA-I in A Rh(-), B Rh (-), AB Rh(-) ve O Rh (-) kan grubu eritrositlerini aglutine eden en düşük doz.

UEA-I'in eritrositleri aglutinasyonu sonucu oluşan görüntünün fotoğrafının çekilmesi için, hemaglutinasyonun en iyi gözlendiği O Rh(-) kan grubu eritrositlerinin %5'lik süspansiyonu hazırlanarak iki ayrı lama birer damla damlatıldı. Kan damlalarının birinin üstüne bir damla 100 μg/ml UEA-I çözeltisi, diğerinin üzerine ise bir damla PBS çözeltisi damlatılarak üzerleri temiz birer lamelle kapatıldı.

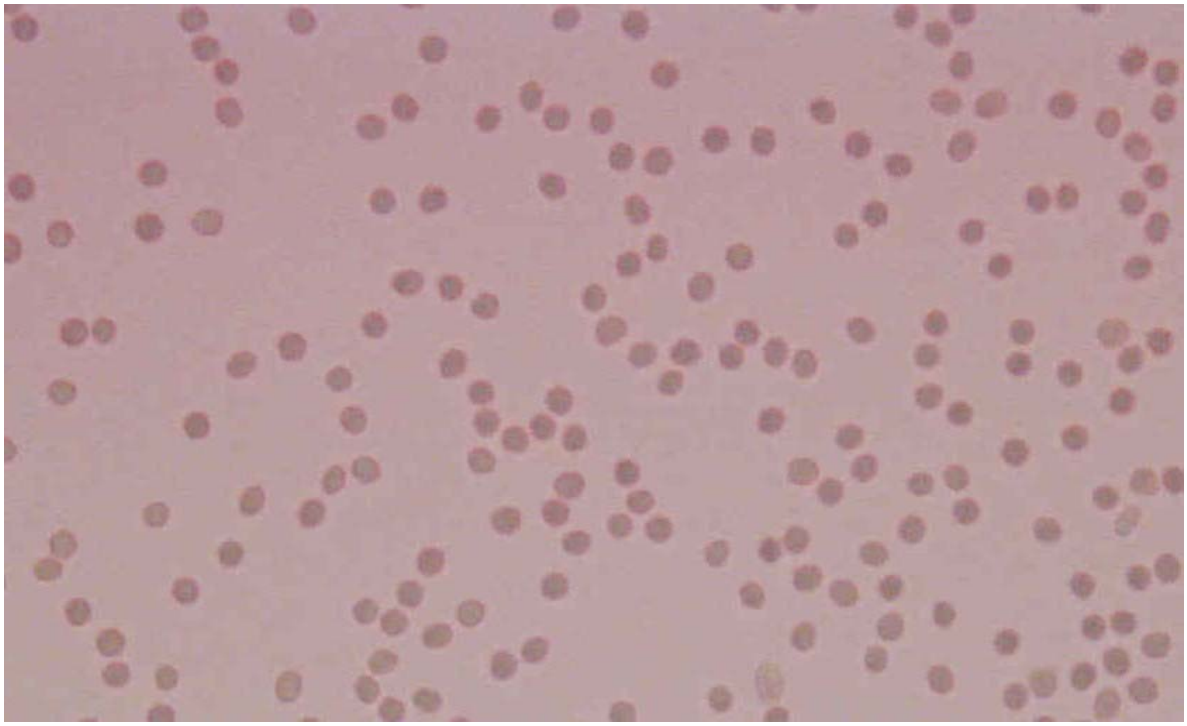
Oda sıcaklığında bir saat bekletilen preparatlar mikroskopta incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflar Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Laboratuvarında çekilmiştir. Fotoğraflarda aglutinasyona uğramış eritrositler birbirine bağlanıp kümelenmiş olarak görülmektedir. Hemaglutinasyona uğramayan eritrositler ise birbirinden ayrı olarak preparatta seçilmektedir. Aglutine olan ve olmayan hücrelerin x40'lıktaki görüntüleri şekil 4.2 ve şekil 4.3 de görülmektedir.



Şekil 4.2. Aglütine olmuş O Rh(-) kan grubu eritrositlerin X40'lık taki görüntüsü.

Şekil 4,2. ' de görüldüğü gibi lektin ilave edilmiş preparatta O Rh(-) kan grubu eritrositleri lektin sayesinde birbirine bağlanarak kümeler halinde aglutine olmuştur.

Aglutine olmuş hücreler fotoğrafta kümeler halinde görülmektedir. Bunun sebebi lektinlerin kendilerine özgü moleküllere bağlanmasıdır. Aglutinasyon olayı, lektinlerin protein kısımlarının hücre yüzeyinde bulunan spesifik oligosakkarit zincirindeki şeker ünitelerine çapraz bağlanması ile oluşmaktadır.



Şekil 4.3 Aglutine olmamış O Rh (-) kan grubu eritrositleri, x40

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi lektin ilave edilmemiş preparatta eritrositler birbirinden ayrı olarak görülmektedir.

Lektinlerin şekerlerle olan bu bağlantılarının antijen-antikor veya enzim-substrat bağlantılarına benzetildiği bildirilmiştir (Slifkin and Doyle 1990, Mc Kenzie 1992 a). Antikorlar, gama globulin yapısında olup, ımmünoglobulin olarak da adlandırılırlar. Tüm immünoglobulinler bir hafif ve bir de ağır polipeptid zincirinin birleşmesinden oluşmuştur. Her ağır ve hafif zincirin değişken ve sabit kısımları vardır.

Değişken bölge her antikor için farklıdır ve belirli bir antijene özgül olarak bağlanan bölge burasıdır. Sabit bölge ise antikorun dokulara yayılmasını, dokularda özgül yapılara yapışmasını, membranlardan geçme ve diğer biyolojik özellikleri belirler.

Ateş ve Akın (1994)'a göre lektinlerin spesifik karbonhidratlarla olan bağlanmaları ve aglutinasyon aktiviteleri temelde antijen ile her antikor tek bir belirli antijene özgüdür. Bunu sağlayan, ağır ve hafif zincirin değişken bölgelerinde yer alan amino asitlerin her antikor için özel olan yapısal düzenidir. Bu düzen her antijene özel yapı için farklı bir uzaysal şekle sahiptir. Antijen bu yapı ile karşılaştığında antijenin çok sayıdaki prostetik grubu, kendisinin ayna görüntüsü olup antikor üzerinde yer alan bölgelere uyar ve bu etkileşimle antijen ile antikor hızla bağlanır (Guyton and Hall 1996).

Ateş ve Akın (1994)'a göre lektinlerin spesifik karbonhidratlarla olan bağlanmaları ve aglutinasyon aktiviteleri temelde antijen ile antikorların bağlanmasına benzemekle birlikte, lektinlerin şekerlerle olan bağlanmaları ve aglutinasyon aktiviteleri antikorlara göre daha basittir. Ayrıca lektinler ve antikorlar, üç boyutlu yapıları, moleküler büyüklükleri, amino asit kompozisyonu ve metal gereksinimleri bakımından da birbirinden farklıdır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada *Ulex europaeus* bitkisinden elde edilen UEA-I lektininin A Rh(-), B Rh(-), AB Rh(-) ve O Rh(-) kan gruplarını aglutine etme aktivitesi ölçüldü. UEA-I lektininin bu kan gruplarını hangi konsantrasyonlarda aglutine ettiği tespit edildi. U tabanlı mikrotitrasyon kabında yapılan deneyde seri dilüsyon yoluyla her kuyucukta azalan bir UEA –I konsantrasyonu oluşturuldu (Frost 1975, Castro 1987)).

Gerçekleşen deney sonucunda; A Rh(-) kan grubu eritrositlerini aglutine etmek için gerekli olan en düşük UEA-I dozunun 50 µg/ml olduğu, B Rh(-) kan grubu eritrositlerini aglutine etmek için gerekli en düşük dozun 25 µg/ml olduğu, AB Rh(-) kan grubu eritrositlerini aglutine etmek için gerekli en düşük dozun 50 µg/ml olduğu ve O Rh(-) kan grubu eritrositlerini aglutine etmek için gerekli olan en düşük UEA-I konsantrasyonunun ise 6.25 µg/ml olduğu tespit edildi (Şekil 4.1.).

Bu dozlar incelenip birbiriyle karşılaştırıldığında O Rh (-) grubu insan kanı eritrositlerini aglutine etmek için diğer üç gruba oranla düşük miktarda hemaglutinine ihtiyaç duyulması UEA-I lektininin O Rh (-) grubu insan kanı eritrositleri için spesifik olduğunu göstermektedir.

Bu deney yapılırken aglutinasyonun hangi maddeden kaynaklandığını gözlemek için kontrol grupları oluşturuldu. U tabanlı mikrotitrasyon kabında her kan grubu için ayrı ayrı hazırlanan kontrol gruplarında kuyucuklardan bazılarına PBS ve eritrosit süspansiyonları beraber, bazılarına sadece eritrosit süspansiyonu, bazılarına ise sadece PBS çözeltisi konuldu. (Frost 1975, Castro 1987). Yapılan gözlemler sonucunda kontrol gruplarında aglutinasyon olayı olmadığı sonucuna varıldı. Bu sebeble meydana gelen aglutinasyonun UEA-I lektininden kaynaklandığı kesinleşmiştir.

Ateş ve Özgür (2003), yaptıkları çalışmada UEA-I'in insan Rh(+) kan grubu eritrositlerini aglutine etme aktivitesini ölçmüşlerdir. Sonuç olarak UEA-I lektininin O Rh(+) kan grubu eritrositlerini aglutine etmede spesifik olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışma UEA-I' in A grubu eritrositlerini 25 µg/ml yoğunlukta, B grubu insan kanı eritrositlerini 25 µg/ml yoğunlukta, AB kan grubu eritrositlerini 50 µg/ml yoğunlukta ve O kan grubu eritrositlerini ise 1.57 µg/ml yoğunlukta aglutine ettiği saptanmıştır (Ateş ve Özgür 2003).

Yapılan başka çalışmalarda da UEA-I lektininin kan grubu bağlama özgüllüğü araştırılmıştır. UEA-I in A, B ve O kan grubu eritrositlerini aglutine etme aktivitesi ölçülmüş ve 1,2 µg/ml yoğunlukta aglutinasyonun olduğu rapor edilmiştir (Horejsi ve Kocoürek 1974). Ancak bu çalışmada kullanılan kan gruplarının Rh (+) mi yoksa Rh (-) mi olduğu belirtilmemiştir.

Yapılan bu çalışma, *Ulex europaeus* agglutinin-I'in, O kan grubu antijeninde bulunan az sayıdaki glikoproteinlerin ortaya çıkarılmasında ve bu antijenlerde bulunan kompleks tip oligosakkaritlerin küçük parçalara ayrılmasında oldukça kullanışlı olduğunu rapor eden Matsui ve ark. (2001) bulguları ile desteklenmektedir.

Lotus tetranogolobus aglutinini (LTA) ile yapılan bir çalışmada, LTA nın %2'lik O grubu eritrositlerini 33 µg/ml konsantrasyonda aglutine ettiği ve bu aglutinasyonun inhibisyonunun L-fukoz tarafından gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Pereira 1974). UEA-I ile LTA aynı şekere (L-fukoz) karşı spesifite gösterirken, UEA-I' in %2'lik O grubu eritrositlerini aglutine etmek için gerekli olan dozu (1.57 µg/ml) oldukça düşüktür. UEA-I ile LTA'nın hem aynı şekere karşı spesifite göstermeleri hem de UEA-I'in O grubu eritrositlerini LTA' ya göre daha düşük dozda aglutine etmesi UEA-I' i; O grubu eritrositlerini A, B, AB grubu eritrositlerinden ayırmada, LTA' ya oranla daha kullanışlı hale getirdiği söylenebilir (Pereira ve ark. 1978).

Phoseolus vulgaris bitkisinden elde edilen fitohemaglutinin A, B ve O grubu eritositleri aglutine etme aktivitesi ölçülmüş ve A grubunu 5 µg/ml'de, B grubunu 40-50 µg/ml'de ve O grubunu 40 µg/ml'de aglutine ederken bu aglutinasyonun D-galaktoz tarafından inhibe edildiği tespit edilmiştir. Bu değerler UEA-I'den elde edilen değerlerle kıyaslandığı zaman, *Phaseolus vulgaris* hemagglutininin UEA-I'e oranla A grubu eritrositlerine karşı daha yüksek, spesifite gösterdiği, buna karşın UEA-I'in de O grubuna karşı olan spisifitesinin *Phaseolus vulgaris*'e oranla daha yüksek olduğu söylenebilir. Ayrıca iki hemagglutinin aglutionasyonu farklı şekerler tarafından gerçekleştirilmektedir.

Ricinus communis bitkisinden elde edilen fitohemaglutinin %2'lik A grubu eritrositlerini 0,09 μg/ml konsantrasyonunda aglutine ederken, hemaglutinasyonun inhibisyonu D-galaktoz tarafından gerçekleştirilmiştir (Kubanek ve ark. 1973).

Bu çalışmada UEA-I'in O Rh(-) kan grubuna karşı olan spesifitesinin kan gruplarının birbirinden ayırt edilmesinde kullanılabileceğini sonucuna varılmıştır. Kan gruplarının tayininde A kan grubu için anti-A antikoru, B kan grubu için ise anti-B antikoru bulunmaktadır, O grubuna karşı ise doğal anti-O antikoru bulunmadığından O grubunun tayininde anti-A ve anti-B antikorları ile reaksiyon vermemesi esas alınmaktadır. Rh faktörü için ise Rh antikoru kullanılır.

Ayrıca *Vicia graminea*'dan elde edilen fitohemaglutininden M ve N grubu eritrositlerini ayırt etmede, ayrıca *Dolichos biflorus*'dan elde edilen aglutininden de A1 ve A2 alt gruplarını ayırt etmede faydalanılmaktadır (Delbaere ve ark 1990).

Yapılan bu çalışmada UEA-I lektininin O Rh (-) kan grubunu daha düşük konsantrasyonda aglutine etmesi, UEA-I lektininin O Rh (-) kan grubu eritrositlerinin yüzeyindeki karbonhidratlara diğer kan gruplarına oranla daha spesifik olduğunu gösterir. Buradan UEA-I lektinine özgü olan karbonhidrat moleküllerinin O Rh (-) kan grubu eritrositlerinin yüzeyinde diğer kan gruplarına oranla daha fazla olduğu sonucuna da varılabilir.

Bu çalışmada ortaya çıkan sonuçlar diğer çalışmalarlada desteklendiği üzere UEA-I lekteninin O Rh(-) kan grubuna karşı yüksek spesifite gösterdiğidir. Bu sonuçta O Rh(-) kan grubunun tayininde kolaylık sağlayabilecek niteliktedir. Bu konsantrasyonlara bakılarak O Rh(-) ve O Rh(+) kan gruplarının farklı konsantrasyonlarda aplutine olduğu görülmektedir. Yapılacak birçok deneme sonucunda eğer bu fark sabit olarak yakalanırsa UEA-I aglutinini O Rh(-) ve O Rh(+) kanlarının birbirinden ayrılmasında da kolaylık sağlayabilecek niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

Ateş, A., O' Farrell, M.K. and Bağcı, H., (1994). Proliferation-Related Expression of Glycoproteins of Swiss Mouse 3T3 Fibroblast. Tr. J. of Biology, 18, 123-131.

Ateş, A., Akın, M., 1994. Lektinler ve kullanım alanları. Tr. J. of Biology, 18:39-45

Ateş, A.,Özgür, Y., 2003. Ulex europaeus Lektininin Kan Grubu Bağlama Özgüllüğü.S.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi 20:1-7.

Barondes, S.H., 1988. Bifunctional properties of lectins redefined. Trends biochem. Sci., 13:480-482

Blumberg, S., and TAL, N., 1976. Biochim. Biophsy. Acta; 453: 357-364.

Bourrilon, R., Aubery, M., 1989. Cell surface glycoproteins in embryonic development. Int. Rev. Cytol., 116: 257-338.

Boyd, W.C., 1963. The lectins : their present status. Vox. Song, 8:1-32

Bresalier, R.S., Mazyrek, N., Sternberk, L.R., Byrd, J. C., Yumlar, L.K., Nangia-Makker, P., Raz, A. 1998. Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the β- galactoside- binding protein galectin-3 Gastroenterology., 115:287-296

Brooks, S. A., Leathem, A. J., 1995. Expression of alpha-GalNAc glycoproteins by breast cancer, Br. J. Cancer 71, 1033-1038

Castro, V. M., Boman, A. J,., 1987, Isolation and Characterization of a group of isolectins with glactose/N-acetyl galactosamine specifity from hemolymin of the giant silk mont Hyalophora *cecropia* (American cockroach). Fur. J. Biochem.; 168:75-82.

Danguy, A., Decaestecker, C, Genten, F., Salmon, I.,and Kıss, R., 1998. Aplications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. Avta, 161:206- 218

Delbaere, L.T.J., Vandonselaar, M., and Prasad, L., 1990. Molecular recognition of a human blood group determinant by a plant lectin. Can. J. Chem., 68:1116-1121

Dennis, J. W.,1985. Partial reversion of the metastatic phenotype in a wheat germ agglutinin-resistant mutant of the murine tumour cell line MDAY-D2 selected with Bandeiraea simplicifolia seed lectins. J. N. C. I., 74, 1111-1120.

Dixon, H.B:F:, 1981. Defining a lectin. Nature, 292:192

http://en.wikipedia.org, 12.12.2007, internet sitesi

Gabius, H.-J. 1997a. Animal lectins.Eur.J. Biochem., 243:543-576.

Gillespie, J.P., and Kanost, M.R., 1997. Biological mediators of insect immunitr. In annual Review of Entomology. (Ed: Mitter, T.E., Radovsky, F.J., and Resh, V. H.); 42:611-643

Grillon, C., Monsigny, M., Kieda, C., 1991. Changes in the expression of lectins in human T lymphocyte mmebrane upon mitogenic stimulation. Charbonhydr. Res. 213;283-292

Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T., and Sharon, N., 1980.What should be called a lectin? Nature, 285:66

Goldstein. I. J., and Poretz, R. D., 1986. Isolation, Physicochemical Characterization and Carbonhydrate-Binding Specifity of Lectins. In "The Lectins" (Eds. Liener, I.E., Sharon, I.J.). Academic Press. Orlando. 33- 248

Guyton, A.C., and Hall, J.E., 1996. Textbook of Medical Physiology. Acta, 304:93-102

Hamashin, C., Spindler, L., Russell, S., Schink A., Lambkin I., O'Mahony D., Houghten R., and Pinilla, C., 2003 Identification of novel small molecule Ulex europaeus-I mimetics for targeted drug delivery. Bioorganic&Medicine Chemistry 11(23):4991-4997.

Hawkes, R., Niday, E., and Gordon, J., 1982. A Dot Immunobinding Assay for Monoclonal and other Antibodies. Anal. Biochem. ; 199: 142-147

Horejsi, V., and Kocoürek, J., 1974. Studies on phytohemaglutinin. Some properties of the anti-H specific phytohemagglutinin of the furza seeds (Ulex europaeus L.). Biochim. Et Biophys. Acta, 336:329-337

Finne, J., and Krusıus, T., 1982. Blood group A and H determinants in polyglycosyl peptides of A_1 and A_2 erythrocytes. J. Biochem., 126;401-406

Fukuda, M., 1991. Lysosomal membrane glycoproteins, structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. J. Biol. chem., 266: 21327-30.

Frost, R.G., Reitherman, R.W., Miller, A. L., and O'Brien, J. S., 1975.Prufication of Ulex europaeus Hemaglutinin-I by affinite chromatography. Analytical Biochemistry., 69,170- 179

Kocourek, I. 1986. In the Lectins (Ed. Liener, I. E., Sharon, N.& Goldstein, I.J.) Academin Press inc., pp 1-32.

Kubanek, J., Entlicher, G., and Kocourek, J., 1973. Biochim Biophys Acta 304:93-102.

Lapidot, T., Lubin, I., Terenzi, A., Factorowich, Y., Erlich, P., and Reisner, Y., 1990, Enhancement of bone marrow allografts from nude mice into mismatched by T cells void of graft-versus-host activity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 4595-4599

Lis, H., and Sharon, N., 1972. Soybean (*Glycine max*) agglutinin. Methods. Enzymol., 28 part/B, 366-368.

Lis , H., Sharon. N., 1977. Lectins: Their chemistry and application to immunology. The antigens., 4: 429-529. Academic Pres, New York, London.

Lis, H., and Sharon, N., 1981 a. Lectins in higher plants in: MARCUS, A., (ed), The Biochemistry of Plants. 6:371-434.

Lis, H., and Sharon, N., 1981 b. In: The Biochemistry of Plants. (MARCUS, A., Ed.), Vol: 6 pp. 371-447, Academic Press Inc., New York.

Lis, H., and Sharon, N., 1986. Lectins as molecules and as tools. Ann. Rev. Biochem., 55: 35-67

Matsui,T., Hamako, J., Ozeki, Y., and Titani, K., 2001. Comperative study of blood group- recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. Biochemica et Biophssica Acta; 1525 (1-2).50-57

Mc Kenzie, A. N. J., and Preston, T.M.., 1992 a. Purification and characterization of a galactose- specific agglutinin from the haemolymph of the larval stages of the insect Clliphora vomitora. Dev. Comp. Immunol., 16, 31- 39.

Mc Kenzie, A. N. J., and Preston, T.M.., 1992 b. Biological characterization of the calliphora vomitoria agglutinin. Dev. Comp. Immunol., 16,85-93.

Monteavaro, C.E., Soto, P., Gimeno, E.J., Echevarría, H.M., Catena,M., Portiansky, E.L., and Barbeito C.G., 2007. Histological and lectin binding changes in the genital tract of mice infected with Tiricomonoas foetus, Journal of Comparative Pathology, Artile in press.

Nichols, W.S., and Nakamura, R.M., 1986. Agglutination and aglutination inhibition assays. In Manual of Chinical Laboratory Immunology. (Ed: Rose, N.R., Friedman, H., and Fahey, J.L.) Third Ed. Pp. 49-56.

Nomenclature Committee Archs. 1981. European Journal of Biochemistry, 114, 1-4.

Olafsen, J.A.,1986. Invertebrate lectins: Biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. In Immunity in Invertebrates (Ed: BREHELİN, M.), pp. 94-111. Springer-Verlog, Berlin, Heidelberg.

Penland, J.C., and Boucias, D.G., 1988. Function of a galactose-binding lectin from Spodoptera exigua larval haemolmph: opsonization of blastospore from entomogenous hyphomycetes. J. Insect Physiol; 34(6): 533-540.

Pereira, M.A.E:, 1974. Lectin from *lotus tetragonolobus* seeds. Biochem . 13, 3184-3192.

Pereira, M.A.E., Kısaılus, E.C., Gruezo, F., Kabat, E.A., 1978. Immunochemical studies on the combining site of the blood group H- specific lectin-I from *Ulex europaeus* seeds. Arch. Biochem. Biophya.,185, 108-115.

Race, R., and Sanger, R., 1975.Blood Groups in man.&th. Ed. pp. 311-322, Blackwell, Oxford.

Rastan, S., Thorpe, S.J., Scudder, J., Brown, S., Govi, H. C., Feizi, T. 1985.Cell interactions in preimplantation embryos, evidence for involvement of saccharides of the poly-N- acetyllactosamin series. J. Embryol. Exp. Morphol., 87: 115-128.

Reisner, V., Sharon, N., & Haran-Ghera, N. 1980. Expression of peanut agglutinin receptors on virus-induced preleukemic cells in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2244-2246.

Renwrantz, L. 1986. Lectins in molluscas and arthropods: Their occurence, origin and roles in immunity. In immune mechanisms in invertebrate vectors. (Ed: Lackie, A.M.) Zool. Soc. London., 21-43.

Richards, E. H., Ratcliffe, N. A., 1990. Direct binding and lectin mediated binding of erythrocytes to haemocytes of the insect, Extatosoma tiaratum. Develop. And Comp. Immunol., 14:269- 281.

Rini, J.M., 1995.Lection structure. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc., 24: 551-577.

Rüdiger, H., Gabius. H.J., 1993.Lectinologie, Geschicte, Konzepte und harmazeutische Bedeutung. Deutsche Apotheker Zeitung., 26:2371-2381

Rüdiger, H., 1997. Structure and functions of plant lectins, in: Glycosciences: status and perspectives (Gabius, H.J., and Gabius, S., eds) pp. 415-439, Chapman&Hall, Weinheim.

Sinowatz, F., Friess, A. E., Wobel, K. H. 1984.Glykoproteins of bovine epididymal spermatozoa a cytochemical study Acta Histochem. Suppl., 29:113-120.

Slifkin, M., and Doyle, R.J., 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 3:197-218.

Sloth, N., 2003. www.biopix.dk internet sitesi.

Sharon, N., 1977. Lectins. Sci. Amer., 236(6): 108-119.

Sharon, N., and Lis, H., 1972. Lectins: Cell-agglutinating and sugar specific proteins. sci., 1977: 949-958.

Sharon, N., Lis, H., 1990. Legume lectins-a large family of homologous proteins, Faseb-Journal; 3198-3208.

Shibata, S., Peters, B.P., Roberts, D.D., Goldstein, I., and Liotta, L.A. 1982. Isolation of Laminin by Affinite Chorotography on Immobilised Griffonia simplicifolia-I Lectin. FEBS LETT.; 142: 194-198.

Vierbüchen, M., 1991. Lectin receptors. In current topics in patology. (Ed: Seıfert, G.), 83; 1-522 Springer- Verlog, Berli, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong-Kong, Barcelona.

Yamamoto, K., Tsujı, T., and Osawa, T., 1998. Analysis of asparagin-linked oligosaccharides by sequential lectin affinity chromatography, Methods. Mal. Biol.;76:35-51.

Wagner, W. L., Herbest, D.R., and Sohmer, S.H., 1999. Manual of the flowing plants of Hawai'i. Revised edition. University of Hawai'i Press, Honolulu. Pp. 715-720.

Wang X., Kochetkova, I., Haddad, A., Hoyt, T., Hone, D.M., and Pascual D.W., 2005 Transgene vaccinization usingUEA-Ifor targeted mucosal immunization against HIV-I envelope., 23(29):3836-3842.

Wieser, R., und Brunner, G.,1982. İnteractions und Regulationsmechanismen der Zelle: Membranlektine- Membranglykomoleküle Biologie in unserer Zeit., 12:97-107.

Zhang, N., Ping, Q. N., Huang, G.H., and Xu W.F., 2005 İnvestigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers of oral administration. İnternational Journal of Pharmaceutics 294(1- 2): 247-259.