

ARALIK 2021

Yüksek Lisans Tezi- Moleküler Biyoloji

DELAL TİVSİZ

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***TILIA CORDATA*'NİN ALERJEN PROTEİNLERİNİN
TANIMLANMASI**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DELAL TİVSİZ

ARALIK 2021

***TILIA CORDATA*'NİN ALERJEN PROTEİNLERİNİN
TANIMLANMASI**

**Gaziantep Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Adı
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ**

DELAL TİVSİZ

Aralık 2021

©2021[DELAL TİVSİZ]

***TILIA CORDATA*’ NIN ALERJEN PROTEİNLERİNİN TANIMLANMASI**

başlıklı bu çalışma, **Delal TİVSİZ** tarafından hazırlanmış ve yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde** Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İshak YÜCE
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

Prof. Dr. Canan CAN
Bölüm Başkanı

.....

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ
Biyoloji
Gaziantep Üniversitesi

.....

Sınav Tarihi: 10 Aralık 2021

Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ
Biyoloji
Gaziantep Üniversitesi

.....

Prof. Dr. İbrahim Halil KILIÇ
Biyoloji
Gaziantep Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Burçin Işık
Hemşirelik
Gaziantep İslam Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilmek suretiyle tezde yer aldığını beyan ederim.

Delal TİVSİZ

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ALLERGENIC PROTEINS FROM *TILIA CORDATA*

TİVSİZ, Delal

M.Sc/ in Molecular Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Işık Didem KARAGÖZ

December 2021

71 pages

There are a lot of environmental allergenic factors such as pollens, fungal spores, house dust mites, some foods and drinks. Although these factors are harmless for most people, they can cause hypersensitivity for some individual. This sensitivity is calling ‘allergy’. Allergens generally has a protein, after Charles Blackey's discovery in 1873 that pollens cause allergic diseases, it has been established that pollen play an important role in allergic diseases. The allergenic properties of pollen are due to the glycoprotein, lipoprotein polysaccharide and proteins found in the exine and intin layers. In this study we investigated the allergenic proteins extracted form *T. cordata* (small-leaved linden) pollen samples collected from Gaziantep region during pollen dissemination period. The morphology of *T. cordata* pollen was determined by examining the slides prepared using the Wodehouse method under an inverted microscope and images of pollen were captured. Total concentrations of the potentially allergenic proteins in the prepared pollen extracts of *T. cordata* were determined using the BCA method. In addition, the SDS-PAGE was used to separate the proteins of *T. cordata* according to their molecular weights, and the proteins were visualized using silver staining. According to our results, *T. cordata* may cause allergic reactions, and that further comprehensive studies are needed. The determination of allergen proteins is very important in terms of making the correct diagnosis, as it constitutes the first step of diagnosis and treatment in allergic diseases.

Key Words: Allergy, Allergen, Pollen, *T. cordata*, Pollen Allergy

ÖZET

***TILIA CORDATA*’NIN ALERJENİK PROTEİNLERİNİN TANIMLANMASI**

TİVSİZ, Delal
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji

Danışman: Doc. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

Aralık 2021

71 sayfa

Polen, mantar sporları, ev tozu akarları, evcil hayvan tüyleri, bazı yiyecek ve içecekler bir çok kişi için zararsız olmasına rağmen bazı kişiler için aşırı duyarlılık meydana getirebilir. Bu duyarlılık alerji olarak adlandırılmıştır. Alerjenler genellikle protein yapıda olup 1873 yılında Charles Blackey’ in polenlerin alerjik hastalıklara neden olduğu keşfinden sonra, alerjik hastalıklarda polenlerin önemli rolü olduğu belirlenmiştir. Polenlerin alerjen özellikleri ekzin ve intin tabakalarında bulunan glikoprotein, lipoprotein, polisakkarit ve proteinlerden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada, Gaziantep bölgesinden toplanan *Tilia cordata* (küçük yapraklı ıhlamur) polenlerinin alerjenik etkisinden sorumlu olan proteinler araştırılmıştır. *T.cordata*’nın polenleri disseminasyon döneminde Gaziantep Üniversitesi yerleşkesinden toplanarak kurutulmuştur. *T. cordata*’nın polen morfolojisini belirlemek için Wodehouse yöntemi ile hazırlanan preparatlar, mikroskop altında incelenerek polenler fotoğraflanmıştır. *T. cordata*’nın polen ekstresi hazırlandıktan sonra alerjen proteinlerinin total konsantrasyonunu saptamak amacı ile BCA yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca *T. cordata*’nın moleküler ağırlıklarına ayırmak amacı ile SDS-page yöntemi kullanılmış ve proteinler gümüş boyama ile görünür hale getirilmiştir. Yapılan çalışmalarda *T. cordata*’nın farklı ağırlıklarda 5 adet alerjen proteine sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında *T. cordata*’nın alerjik reaksiyonlara neden olabileceğini ve daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu desteklemektedir. Alerjen proteinlerin tayini, alerjik hastalıklarda tanı ve tedavinin ilk basamağını oluşturması doğru teşhis yapılması açısından oldukça önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alerji, Alerjen, Polen, *T. cordata*, Polen Alerjisi,



“Sevgili aileme”

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, sayın Doc. Dr Işık Didem Karagöz'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Örneklerin toplanmasında, preparasyonunda ve teşhislerinde desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşım uzman biyolog Başak Simitçioğlu'na, yardım ve desteklerinden dolayı sayın Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Karaman'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışmada maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimine (FEF.YLT.19.30 no'lu proje) teşekkürlerimi sunarım. Çalışma süresince beni hep destekleyen ve güvenen çok sevdiğim biricik annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT	v
ÖZET	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
1.1. Alerji	7
1.2. Alerjenlerin Biyolojik Aktivitesi	11
1.3. Polen Alerjisi	14
1.5. Polen Morfolojisi	19
1.6. Polen Duvarı (Sporoderm)	22
1.7. Angiosperm Polen Duvarı	23
1.8. Gymnosperm Polen Duvarı	24
1.9. <i>Tilia Cordata</i> 'nın Polen Morfolojisi	25
1.10. Polinasyon (tozlaşma)	27
1.11. Polen Alerjisinde Tanı	27
1.11.1 Skin Prick Test	28
1.11.2 İntradermal Testler	29
1.11.3 Serolojik testler	29
1.11.4 Nazal Provakasyon Testleri	30
1.12. Alerji Tedavi Yöntemleri	30
1.12.1 Alerjen Immunoterapi ve Rekombinant DNA	30
BÖLÜM II LİTERATÜR TARAMASI	33
Kaynak Özetleri	33
3.1 Materyal	36

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	37
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar	37
3.2 Metot.....	40
3.2.1. Polen Örnekleri	40
3.2.2 Polen Örneklerinin Toplanması ve Eldesi	40
3.2.3 Polen Morfoloji Çalışmaları.....	42
3.2.4 Polen Ekstrelerinin Hazırlanması.....	43
3.2.5 Polen Ekstresindeki Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	44
3.2.6 SDS PAGE ELEKTROFOREZ	45
3.2.7 Gümüş Boyama.....	48
BÖLÜM IV BULGULAR.....	51
4.1 Polen Morfolojisi	51
4.2. Polen Ekstrelerinin Protein Konsantrasyonu Saptanması	52
4.3 SDS-PAGE ile alerjenik proteinlerin görüntülenmesi	53
BÖLÜM V TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	58
CV	71

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1	Alerjik reaksiyonlarda salgılanan antikor türleri.....	3
Tablo: 3.1	Amonyum bikarbonat çözeltisinin hazırlanması.....	41
Tablo: 3.2	SDS-PAGE çözeltileri.....	45
Tablo 3.3	Separating gel (ayırma jeli) için gerekli çözeltiler.....	46
Tablo 3.4	Stacking gel (yükleme jeli) için gerekli çözeltiler.....	46
Tablo 3.5	Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	Akut ve Kronik Alerjik Reaksiyon Yolları.....	12
Şekil 1.2	Polen ve bitkisel besin alerjen proteinlerinin dağılımı.....	17
Şekil 1.3	<i>T.cordata</i>	19
Şekil 1.4	<i>T.cordata</i> yaprak, meyve ve çiçekleri.....	19
Şekil 1.5	Tetrad yapısı	23
Şekil 1.6	Polen ekvatoryal düzlemi	23
Şekil 1.7	Polen duvar tabakalaşması.....	24
Şekil 1.8	Kostal polen.....	25
Şekil 1.9	Gymnosperm sakkat poleninde terminoloji.....	26
Şekil 1.10	Polar görünüm	257
Şekil 1.11	Apertür.....	27
Şekil 1.12	Kuru Polen Taneleri.....	28
Şekil 1.13	<i>T.cordata</i> 'ya ait polen görüntüleri.....	29
Şekil 3.3	<i>T.cordata</i> 'ya ait mikroskop görüntüleri	46
Şekil 3.4	BCA yöntem basamakları.....	49
Şekil 3.3	<i>T.cordata</i> 'nın polenlerine ait mikrofotografla.....	56
Şekil 4.1	BSA standart grafiği	57
Şekil 4.2	<i>T. cordata</i> alerjen proteinlerine ait SDS-PAGE görüntüleri	58

KISALTMALAR LİSTESİ

SPT	Skin Prick Test
MHC	Major Histocompatibility Complex
GINA	The Global Initiative for Asthma
SAC	Mevsimsel alerjik konjonktivit
ALBE	Alerji Veri Tabanı
rDNA	Rekombinant Deoksiribonükleik asit
CBER	Biyolojik Değerlendirme ve Araştırma Merkezi
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
RAST	Radyoallergosorbent testi
NPT	Nazal Provakasyon Testi
SLIT	Sublingual immunoterapi
SCIT	Deri altı immunoterapi
PK	Preustniz-Kustuner
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
BCA	Bişinkoninik asit
BSA	Bovin serum albumin

BÖLÜM I

GİRİŞ

Hipokrat alerjik reaksiyonları tanımlayan belki de ilk kişiydi. Bununla birlikte, alerjik bir hastalığın ilk modern tanımı 1819 gibi erken bir tarihte, bugün "**astım**" ve "**alerjik rinit**" olarak bilinen, klinik bir semptomu açıkça tanımlayan Jonathan Bostock tarafından yayınlandı. Bu klinik durum için '**yaz nezlesi**' terimini kullandı. 1872'de Harvard Üniversitesi'nde (ABD) akademisyen olan Wyman, saman nezlesine neden olan ajan olarak kanaryaotu (*Ambrosia artemisiifolia* L.) polenini tanımladı. Daha sonra 1873'de Manchester, İngiltere'de bir doktor olan Blackey, alerjik bir hastanın ön kolunun derisinin çizilmiş olan kısmına çimen poleni özütü sürerek ilk cilt testini gerçekleştiren ve yara şeklinde bir alerjik reaksiyon gelişimini gözlemleyerek bu deneyi yapan ilk kişiydi (Pehlivan, 1984).

Polenlerin alerjik hastalıklardaki rolü ise 1690 yılında Reidlin'in güllerin astıma neden olduğu hipotezini öne sürmesiyle önem kazanmıştır. Daha sonra ise Bostock yapmış olduğu burun, deri ve göz testleri ile polenlerin alerjiye neden olduğunu kanıtlamıştır. 1911'de, bulaşıcı hastalık uzmanı olan Leonard Noon, vücudun polen maruziyetine ikincil olarak ürettiğini düşündüğü 'toksini' nötralize etmek için hastanın 'polen antitoksin' geliştirmesini sağlamak amacıyla alerjik hastalara polen özü enjekte etmiştir. Alerjik bir bireyin konjonktivasına damlatmak için alerjik özün çeşitli dilüsyonlarının kullanıldığı bir protokol geliştirmiştir. Polen ekstraktının gücü, kızarıklık oluşumu ve konjonktiva iltihabı ile belirlenmiştir. 1930'da Fransız Hansel, tek bir alerjenik materyal yerine çeşitli seyreltmeler kullanarak deri testi yapmaya başlamıştır. İlk kez 1944'de H. A. Hayde tarafından kullanılan "**Palinoloji**" terimi (polen ve sporları araştıran bilim dalı) daha sonraki yıllarda aşama kaydederek kendi içinde polen kimyası, polen fizyolojisi ve polen morfolojisi gibi alt dallara ayrılmıştır (Pehlivan, 1995). Aerobioloji terimi ise 1930'larda Amerika Birleşik

Devletleri Tarım Bakanlığı'nda çalışan bitki patoloğu F.C. Meier tarafından kullanılmıştır. Ancak bu, 1930' lardan önce aerobiyojik çalışmaların yapılmadığı

anlamına gelmemektedir. **Aerobioloji**, havadaki biyopartiküllerin, yani biyolojik kökenli partiküllerin (hem bitkilerden hem de hayvanlardan) inceleyen bilim dalıdır. 1930'ları takiben, aerobioloji temel olarak iç ortam aerobiolojisi ve dış ortam aerobiolojisi olarak sınıflandırılmıştır. Bazı aerobiologlar, atmosferdeki polen çalışmalarını, aerobiolojinin “aeropalinoloji” olarak adlandırılan bir alt dalına ayırmayı tercih etmişlerdir. Hava yoluyla taşınan polenlerle ilgili yapılan çalışmalara “**aeropalinoloji**” denilebilir.

Gregory'ye (1961, 1973) göre; **aerobioloji** genellikle pasif olarak havada taşınan mikroorganizmaların; kimliklerinin, davranışlarının, hareketlerinin ve hayatta kalmalarının incelenmesi olarak tanımlanır. Bu bilim alanı: tanımlama, morfoloji, fizyoloji, yaşayabilirlik, uzun ömür, örnekleme, konsantrasyonlar, günlük ve mevsimsel modeller, fenoloji, emisyon, taşıma, dağılım, tozlaşma gibi alt başlıkları içerir. Polen, tozlaşma, döllenme, tohum ve meyve oluşumu ve bitkilerin çoğalmasından sorumlu olduğu için doğanın insanlığa armağanıdır. Ancak polenlerin bir kısmı hava akımına girdikten sonra atmosferde yüzer halde kalır. Bu polenlerin bazıları insanlarla temas ettiğinde alerjik belirtilere neden olur (Shripad, 2009).

Hepimiz gün içerisinde polenlerden, ev tozu akarlarından ve kedi tüylerinden kaynaklanan aeroalerjenleri soluruz. Bu aeroalerjenler bir çok birey için zararsız olsa da bazı bireylerde antijenlere karşı aşırı yanıt oluşur (Gemicioğlu, 1998). Gün içinde maruz kalınan aeroalerjenler (ev tozu akarları, polenler, mantar sporları, bazı yiyecekler, evcil hayvan tüyleri gibi) bazı bireylerde aşırı hassasiyet sonucu duyarlılık meydana getirir. Bu hassasiyet (sensitivity) **alerji** olarak adlandırılmıştır (Cabi, 2005). Bu duyarlılığın oluşmasında hem genetik hem de çevresel (hava derecesi, rüzgarlar, hava kirliliği) faktörler etkilidir (Asher, 2010). Alerjiye neden olan faktörler ise alerjen olarak adlandırılmıştır. Alerjenler iç ve dış ortam olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. İç ortam alerjenleri; hamam böcekleri, ev tozu akarları, evcil hayvan tüyleri gösterilirken dış ortam alerjenleri ise çimenler, ağaçlar, hububat, mantar sporları ve polenler gösterilebilir. Polenler dış ortam alerjenleri arasında alerjiye en çok neden olan aeroalerjenlerdir. Bir çok ağaç ve bitkinin polenlerinin alerjiye neden olduğu bilinmektedir. Bölgelere göre alerjiye neden olan

ağaçların türleri de değişkenlik göstermektedir. Kuzey, Orta ve Doğu Avrupa’da Huş ağacı (Birch, *Betula*), Akdeniz bölgesinde ise Zeytin (*Olea europaea*) ve de Servi (Cypress-*Cupressus*) türleri çoğunlukla alerjiye neden olmaktadır. Ayrıca zeytin poleni alerjik rinitin İspanya, Güney İtalya, Yunanistan ve Türkiye’deki en önemli sebepleri arasında gösterilmektedir (D’amato, 2007).

Alerjen faktörler (polenler, ev tozu akarları, hayvan tüyleri, bakteriler, mantarlar, çeşitli yiyecekler, bazı kimyasal ve ilaçlar) alerjik rinit (saman nezlesi), alerjik dermatit, alerjik astım, rinokonjonktivit, besin alerjisi gibi hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Celik vd., 2005; Tarkan vd., 2009). Her bir alerjen faktör farklı alerjik bileşenler içerebilir ve yapısında protein barındıran her şey alerjen özellik gösterebilir. Alerjen bileşenleri genel olarak birkaç farklı epitop (ilgili antikorun bağlanmasından sorumlu üç boyutlu bağlanma bölgesi) barındırır. Ve bu epitop ya da alerjenler için henüz bilinen ortak bir yapı yoktur. Bununla birlikte her bir türe ait özel bir alerjen epitopu vardır ve bu epitoplara karşı üretilen antikorlar da sadece bu türe ait alerjen epitopuna bağlanır. Bir proteine karşı üretilen antikor aynı ya da benzer yapıdaki başka türlerin proteinlerine de bağlanabilmektedir. Bu durum **çapraz reaksiyon** olarak adlandırılmıştır (Sastre, 2010).

Polene karşı duyarlılık ya bir alerji skin prick testi (SPT) ile ya da alerjene özgü IgE'nin belirlenmesi ile tanımlanır. Bununla birlikte, bu testlerden herhangi birinin pozitif sonucu, belirli polenlere karşı duyarlılığı gösterir, ancak bu duyarlılığın klinik önemi ile yani maruziyet üzerine semptom gelişimi ile tam olarak ilişkili değildir. Yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir. Bir alerjenin, onu hassasiyetle sonuçlanmayan diğer polen bileşenlerinden ayıran özellikleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Radauer, 2008; Traidl-Hoffmann, 2009). Alerjik hastalıklar, genetik yapı ile çevresel faktörlerin karmaşık etkileşiminin bir sonucudur. Alerjik reaksiyonlar antikor ya da hücre kaynaklı olabilir. Gell ve Combs 1963’de yaptıkları çalışmalar ile alerjik reaksiyonları 4 gruba ayırmıştır; (Tip I , Tip II, Tip III, Tip IV) (Tablo1.1). Bir çok hastada alerjik reaksiyonlardan sorumlu antikor IgE izotipindedir ve bu reaksiyonlar IgE aracılı alerji olarak adlandırılır. IgE aracılı alerjiler popülasyonun %25'inden fazlasını etkiler. Bazı bireylerde bazı alerjenlere karşı IgE üretme yeteneği yüksektir. Bu genetik yatkınlık atopi olarak adlandırılmıştır (Ring vd., 2006). “**Atopi**” terimi (Yunanca “atopostan” gelir ”nadir, nadiren” anlamında) genellikle IgE antikor aracılı alerji

hastalıkları tanımlamak için kullanılır. Atopili bireylere “**atopik**” bireyler denir. Bu bireylerin serumlarında IgE düzeyi yüksektir. Bunların Major Histocompatibility Complex (MHC) gen fokuslarına (HLA-B₈, HLA-D_w) bağlı olarak kalıtsal olduğu düşünülmektedir. Atopisi olan bir kişide, cilt, burun veya hava yolunun tek bir doz alerjene maruz kalması, hapşırma ve burun akıntısı veya dakikalar içinde hırıltıya neden olur (Mackay, 2001).

Tablo 1.1 Alerjik reaksiyonlarda salgılanan antikor türleri

<i>REAKSİYON</i>	<i>ANTİKOR</i>
Tip I anaflaksi	IgE
Tip II sitotoksik antikor	IgE ve IgM
Tip III immün kompleks	IgG ya da IgM
Tip IV geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu	-

Bazı alerjik hastalıklar kontakt dermatit ve hipersensitif pnömoni gibi IgE mekanizmasından bağımsız olarak gelişir ve bunlarda non atopik (atopik olmayan) alerjik hastalıklar olarak nitelendirilmiştir. Genelde atopik olmayan yetişkin ve çocuklarda düşük dereceli immun cevap oluşur; alerjen spesifik IgG1 ve IgG4 antikorları üretirler ve *in vitro* ortamda T hücreli alerjenlere proliferasyon derecesinde hafif ve yardımcı T hücreleri tarafından üretilen interferon γ ile cevap verir. Atopik bireyler ise bunun aksine alerjen spesifik IgE antikorları tarafından karakterize edilen aşırı yanıt oluşturmaları; yüksek IgE antikor içeren serum ve yaygın alerjenlere karşı deri prick testleri pozitif çıkmıştır. Bu bireylerin *in vitro* ortamda alerjenlere yanıt oluşturan kanlarındaki T hücreleri, Tip 2 yardımcı T hücreleri tarafından üretilen sitokinezi indükler. Alerjik duyarlılığın artmasına neden olan en önemli aeroalerjenler polenlerdir (Behrendt ve Becker, 2001). Atmosferdeki polen konsantrasyonu iklim, yağış miktarı, sıcaklık, nem, rüzgar ve coğrafi alandaki bitki örtüsüne bağlı olarak değişiklik gösterir. Polen konsantrasyonun kuru ve güneşli havalarda arttığı bilinmektedir. Polenler çeşitli yollarla atmosferde yayılır ve genellikle solunum yoluyla vücuda girerek insanlarda alerjik astım ve alerjik rinit

gibi hastalıklara neden olurlar (Spieskma, 1991; Ventura vd., 2007). Alerjik hassasiyet hayatın herhangi bir aşamasında yeniden ortaya çıkabilir. Bununla birlikte, bu hastalıkların çocukluk döneminde, başlangıçta hafif bir biçimde ortaya çıkması çok daha yaygındır (Jae - Won, 2018).

Atmosferin alerjenik içeriği, iklim, bitki örtüsüne ve coğrafyaya göre değişir. Havadaki alerjenik polenlerin varlığı ve prevalansına ilişkin veriler hem aerobiyojik çalışmalardan hem de alerjik araştırmalardan elde edilenlere göre örnekleme alanındaki bitkilerin çiçeklenme süresi ile polen takvimlerini hazırlamayı mümkün kılar. Polen takvimi sayesinde polen üretimi, (yıldan yıla yayılma tozlaşma sezonu öncesi hava koşullarına bağlı olsa da) farklı alanlardaki yüksek atmosferik alerjen polen konsantrasyonlarıyla karşılaşma olasılığını tahmin etmek mümkündür. Aerobiyojik ve alerjik araştırmalar, kültürel faktörlerin bir sonucu olarak (örneğin, kentsel park alanları için huş ağacı ve selvi gibi bitkilerin ithalatı) Avrupa'nın polen haritasının da değiştiğini göstermektedir. Ayrıca, son birkaç yılda polen ve polenlerle ilgili deneysel veriler polenin patojenik rolü ve polen ile hava kirleticileri arasındaki etkileşim, subpolen partikül yapısı, solunum yolu alerjik hastalıklarının mekanizmalarına yeni bakış açıları kazandırmıştır (D'amato, 2007).

Araştırmacılar ilerleyen yıllarda, immunokompetan B lenfositleri tarafından IgE üretiminin kontrolü, inflamatuvar hücrelerin toplanmasının başlatılması ve alerjik inflamasyon alanlarında Ig E ile sensitize olmuş efektör hücrelerden vazoaktif mediatörlerin salınımını içeren acil hipersensitivitenin temel biyolojik mekanizmalarını keşfetmeye yönelmişlerdir (Pincus, 2011).

1963'de Gell ve Combs tarafından yapılan alerji sınıflandırmasına göre polen alerjisi Tip 1 grubuna dahildir (Puc, 2003; Reid ve Gamble, 2009).

Sınıflandırmaya göre;

Tip 1 - Anaflaktik tip (immediate) aşırı duyarlılık reaksiyonları: Atopiye ve anafilaksiye bağlı reaksiyon ve hastalıklarda (astım, alerjik rinit, atopik dermatit, alerjik konjonktivit) gözlenir. Atopik bireylerde karşılaşılan alerjenin antijeni sunan hücre tarafından işlenerek T helper lenfosit sunulması, T helper2 lenfositlerin aktivasyonu ile B lenfositten Ig salgınması ve bunların bazofil, mast hücresi ve eozinofil gibi Fc reseptörü bulunan hücrelere bağlanarak kişinin sensitize olması ile

başlar. Organizma yeniden aynı alerjene maruz kaldığında bu hücrelerdeki IgE' ye bağlanmasıyla salınan mediyatörler patolojik reaksiyonlara neden olur.

Tip 2 - Sitotoksik tip aşırı duyarlılık reaksiyonları: bilinmeyen nedenlerle eritrosit, trombosit, glomerül veya alveol bazal membranı gibi hücrelere bağlı olmuş yüzeysel antijenlere IgM veya IgG antikorlarının birleşmesi sonucu meydana gelen aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Tip 2 reaksiyon eritroblastozis, Goodpasture sendromu, trombositopenik purpura ve bazı ilaç reaksiyonlarında görülebilir.

Tip 3 - Antijen antikor kompleksine bağlı aşırı duyarlılık reaksiyonları: Antijen ve özgül antikorların birleşmesi sonucu oluşan ve suda eriyen komplekslerin aktive olması sonucu oluşur. Komplekslerin çeşitli organlarda, damar endotelleri, glomerül tübüllerinin epiteline yapışması sonucunda anaflatoksin ve 4 çeşit kemotaktik madde ortaya çıkar. Lökositlerin, mast hücrelerinin ve trombositlerin o bölgeye çekilmesi lizozomal enzimlerin, histamin ve vazoaaktif aminlerin açığa çıkarak kapillerin geçirgenliğini arttırması gibi patolojik olaylar ortaya çıkar. Artus reaksiyonu, serum hastalığı, immun kompleks hastalıkları ve bazı otoimmun hastalıklara neden olabilir.

Tip 4 - Hücresel tip veya geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu: Hücresel bağışıklığın sorumlu olduğu, 12 saatten geç oluşan reaksiyonlardır. Bu tip reaksiyonlarda antijenle karşılaşan T hücreleri duyarlı hale gelir. Bu özel antijenle daha sonraki temaslarda o bölgede lenfosit ve makrofaj yığılması ve bunlardan çıkan ürünlerin meydana getirdiği reaksiyonlar görülür. Başlıca 3 tipe ayrılır; Kontakt tip, tüberkülin tipi, granümatöz tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarıdır.

Bütün (bozulmamış) polen taneleri, hasta semptomlarını alerjen maruziyetiyle ilişkilendirmenin bir yolu olarak sayılır. Polen taneciklerine maruz kalma ile alerjik konjonktivit arasında bir doz-yanıt ilişkisi kurmanın zor olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, geçtiğimiz 5 yıl içinde, iklim değişikliğinin mevsimsel alerji üzerindeki etkisinin yanı sıra oküler semptomlarla ilişkili erken ve geç faz reaksiyonu hakkında daha iyi veriler elde edilmiştir (Sharma, 2010).

İnsan konjonktivasının alerjen yüklemesi, oküler alerjik reaksiyonun bifazik olduğunu defalarca göstermiştir (Choi, 2008). Hem erken hem de geç fazlar IgE aracılıdır ve mast hücrelerinin bir antijen tarafından ilk aktivasyonuna bağlıdır.

Anında yanıt tipik olarak 20-30 dakika sürerken, geç faz reaksiyonları hastaların % 33-100'ünde 4 ile 24 saat arasında meydana gelir (Abelson, 1990). Erken faz reaksiyonları, alerjen yüklemesinden sonra gözyaşlarında gözlenebilen yüksek histamin, kininler, prostaglandin D2, albümin ve N-a-tosil L-argenin metil ester-esteraz aktivitesi seviyeleri ile ilişkilidir. Geç faz reaksiyonu ile makrofajlar ve nötrofiller için 3 saatte, eozinofiller ve lenfositler için 24 saatte gözlenen enflamatuvar hücrelerde maksimum artış vardır (Leonardi, 1992).

1.1. Alerji

‘‘Alerji ‘‘ terimi 1906 yılında von Pirquet tarafından kullanılmış olup, aynı zamanda von Pirquet hem koruyucu bağışıklık hem de aşırı duyarlılık reaksiyonlarında antijenlerin reaktivitede değişikliklere neden olduğunu fark etmiştir (Mackay, 2001). Çoğu alerjen, doğal hallerinde enzimler olarak işlev gören, örneğin proteolizi indükleyen çözüner proteinlerdir. Alerjenik özellikler, enzimatik aktivite (artmış mukozal geçirgenlik) ve aerodinamik özellikler ile ilgili olabilir ve bunlar da partikülün boyutuna bağlıdır (Mackay, 2001). Genellikle 10-60 kDa moleküler ağırlığa sahip proteinler veya glikoproteinler olan alerjenler, küçük bir miktarı aşırı reaksiyona neden olarak immun sistemin dengesini bozmaktadır (Jae-Won, 2018).

Alerjik inflamasyon, sinir büyüme faktörü, beyinden türetilmiş nörotrofik faktör ve nörotrofin-3'ün etkisiyle sinir hücrelerinden nöropeptitlerin salınımını da takip edebilir (Bonini, 1999; Braun, 2000). Bu nörotrofinler; makrofajlar, T hücreleri, eozinofiller ve mast hücreleri tarafından salgılanır (Braun, 2000). Nöropeptidler, özellikle P maddesi, kalsitonin gen ilişkili peptid ve nörokinin A, vazodilatasyon, artmış asküler geçirgenlik ve akciğerde hava yolunda düz kaslarının kasılması ve mukusun aşırı salgılanması dahil olmak üzere alerjik inflamasyonun karakteristik özelliklerine neden olur (Belvisi, 1997). Ayrıca akciğerlerdeki mast hücrelerinden histamin salgırlarlar (Forsythe, 2000). Triptaz ayrıca proteaz ile aktive olan reseptörlere bağlanarak sinir hücrelerini nöropeptitleri serbest bırakmak için tetikleyebilir. Kronik alerjik reaksiyonların daha fazla amplifikasyonuna histamin salgılayan faktör veya faktörler aracılık edebilir (Steinhoff, 2000).

Alerjen kaynakları bir çok alerjik hastalığa neden olabilir. Alerjik rahatsızlıklar çoğu zaman ölümcül olmamakla birlikte yaşam kalitesini düşüren problemler arasında gösterilebilir. Rinit, alerjik astım, rinokonjonktivit, ürtiker bu alerjik hastalıklara örnek verilebilir. Alerjik rinit, her yaştan insanı etkileyen, genç yaşlarda pik yapan çok yaygın bir hastalıktır. Rinit, klinik olarak burun kaşınması, hapşırtma, burun tıkanıklığı veya rinore (ön veya arka) ve bazen koku duyusunda azalma (hipozmi) gibi semptomlarla karakterizedir. Bu alerjik hastalık çoğu zaman göz ardı edilir yada yanlış teşhis edilir (Grenier, 2011)

Alerjik rinit ciddi bir hastalık olmasa da, bir çok komplikasyonun altında yattığı, astım kontrolü için önemli bir risk faktörü olduğu ve bireyin işte veya okulda yaşam kalitesini ve üretkenliği etkilediği için klinik olarak önemlidir (D'Amato, 2007).

Astım 2006'da GINA (The Global Initiative for Asthma) tanımına göre; bir çok hücrel faktörün rol oynadığı kronik bir hastalıktır. Solunum yollarında aşırı duyarlılığa yol açıp, nefes darlığı, nöbet şeklinde öksürük ve göğüste sıkışmaya neden olur (Levy, 2006). Yapılan araştırmalarda astımın prevalansı Asya, Afrika, Eskimolarda %1'in altında iken Avustralya ve Yeni Zelanda'nın bazı bölgelerinde ise %20'nin üzerinde seyredilmektedir (Kalyoncu, 2001). Ülkemizde ise çocuklardaki astım prevalansı %3.8-16.4 arasında değişkenlik gösterirken, ortalaması %10 civarındadır. Yetişkin bireylerde ise prevalans %2.1-7.6 arasındadır (Küçükusta, 2005).

Alerjik konjonktivit en belirgin semptomu, hafiften şiddetliye değişen oküler kaşıntıdır. Diğer belirtiler arasında kızarıklık, şişme, yanma hissi gözlerde veya göz kapaklarında dolgunluk, ovma dürtüsü, ışığa duyarlılık ve bazen bulanık görme vardır. Mevsimsel alerjik konjonktivit (seasonal allergic conjunctivitis, SAC) dağılımı büyük ölçüde iklime bağlıdır. Örneğin belirli bir bölgede çimen polenleri Mayıs-Ağustos arasında etkili olurken bunun aksine kanarya otu polenleri bir çok bölgede Ağustos-Ekim arasında etkilidir. Ağaç polenleri ise Şubat'tan Haziran'a kadar etkili olabilir. Bu yönden alerjik konjoktit alerjik rinitle paralellik gösterir (Jae-Won, 2018).

Alerjik reaksiyonların en ciddi ve hatta ölümcül olanı anaflaktik şoktur. Anaflaktik şok ya IgE aracılığı ile ya da diğer immünopatolojik yollarla bazofillerin ve mast hücrelerinin degranüle olması sonucu açığa çıkan mediyatörler aracılığı ile meydana

gelmektedir (Doğru, 2011). Anaflaktik şok (anaflaksi) çok sık meydana gelmese de nadir denilecek kadar az da değildir. Yılda 8-24/1000 kişiyi etkilediği bilinmektedir (Soyer, 2007). Literatür incelemesinde anafilaksin her 10.000'de 0.5-3 kişiyi etkilediği; milyonda 1-3 kişinin ölümüne neden olduğu saptanmıştır (Moneret-Vautrin, 2005). Anaflaksi ile ilgili deri, solunum, dolaşım, gastrointestinal sistem ve nörolojik sistemlerde bulgulara rastlanmaktadır. Reaksiyon ne kadar hızlı ortaya çıkarsa anaflakside o denli ağır olur (Doğru, 2011).

Anaflakside en önemli ilaç epinefrindir. Epinefrinin geç uygulanması durumunda ciddi solunum ve kardiyovasküler komplikasyonlara bağlı ölüm gerçekleşebilir (Soyer, 2007).

Kimyasal ve moleküler biyolojik yaklaşımlarla alerjen karakterizasyonu ve sekans belirlemede son birkaç yılda hızlı ilerlemeler kaydedilmiştir. Bilinen alerjenler için yararlı bir kaynak olan Alerjen Veri tabanıdır (ALBE). Alerjenlerin biyokimyasal ve immünolojik özelliklerini, biliniyorsa sekans verileri ile birlikte derlemektedir. (Marsh, 1992). Ayrıca rekombinant DNA (rDNA) teknolojisinin de alerjenlerin karakterize edilmesinde güçlü bir kaynak olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca bu teknoloji, tip I alerjik hastalıkların tanı ve tedavisi için klonlanmış alerjenler sağlayabilir.

Şimdiye kadar, alerjenik proteinler içeren protein özütlerinin standardize edilmesi oldukça zor olmuştur ve bazen önemli alerjenler saptanamamıştır (Jarolim, 1989). Örneğin; akar özütlerinde majör bir akar alerjeni ve *Betula* (huş) polen alerjeni bulunmadığı saptanmıştır.

Bireylerin doğuştan alerjik olması alışılmadık bir durumdur. Alerjik bireylerin çoğu sadece alerjik olma kapasitesini miras alır. Genellikle bir enfeksiyon sırasında veya aşırı hava kirliliğine maruz kaldıklarında alerjene duyarlı hale gelirler. Solunum yolu ve intestinal yol boyunca bulunan mukoza zarları, sağlıklı bireylerde yabancı maddelerin vücut dokularına girmesini önlemede oldukça etkilidir. Bununla birlikte, enfeksiyonların veya hava kirliliğinin neden olduğu inflamasyon, mukoza örtüsünü bozar ve yabancı proteinlerin değişmeden nüfuz etmesine izin verir. Bağışıklık sistemi bu alerjenlere özgü antikorlar üretir. Bu alerjenlere daha sonra maruz kaldığında, mukoza zarı sağlam olsa bile, bağışıklık sistemi, bu yabancı maddelerin istilasını önlemek için (B, T hücreleri, mast hücreleri ve benzeri gibi) özel hücreler tarafından ajanların salınmasını uyarır. Bu ajanlar ödem, lokal dokulara artan kan

akışı ile konjesyon ve sulu sekresyonlar üretir. Bu tepkiler alerjik semptomlarla sonuçlanır ve bunlar soğuk algınlığı semptomlarına benzer. Alerjenlere tekrar tekrar maruz kalındığında, bazı hastalar giderek daha fazla duyarlı hale gelir. Diğer hastalar ise zamanla daha iyi olma eğilimindedir (Romagnani, 2004; Heinrich, 2004; Basehore, 2004; Platts-Mills, 2005).

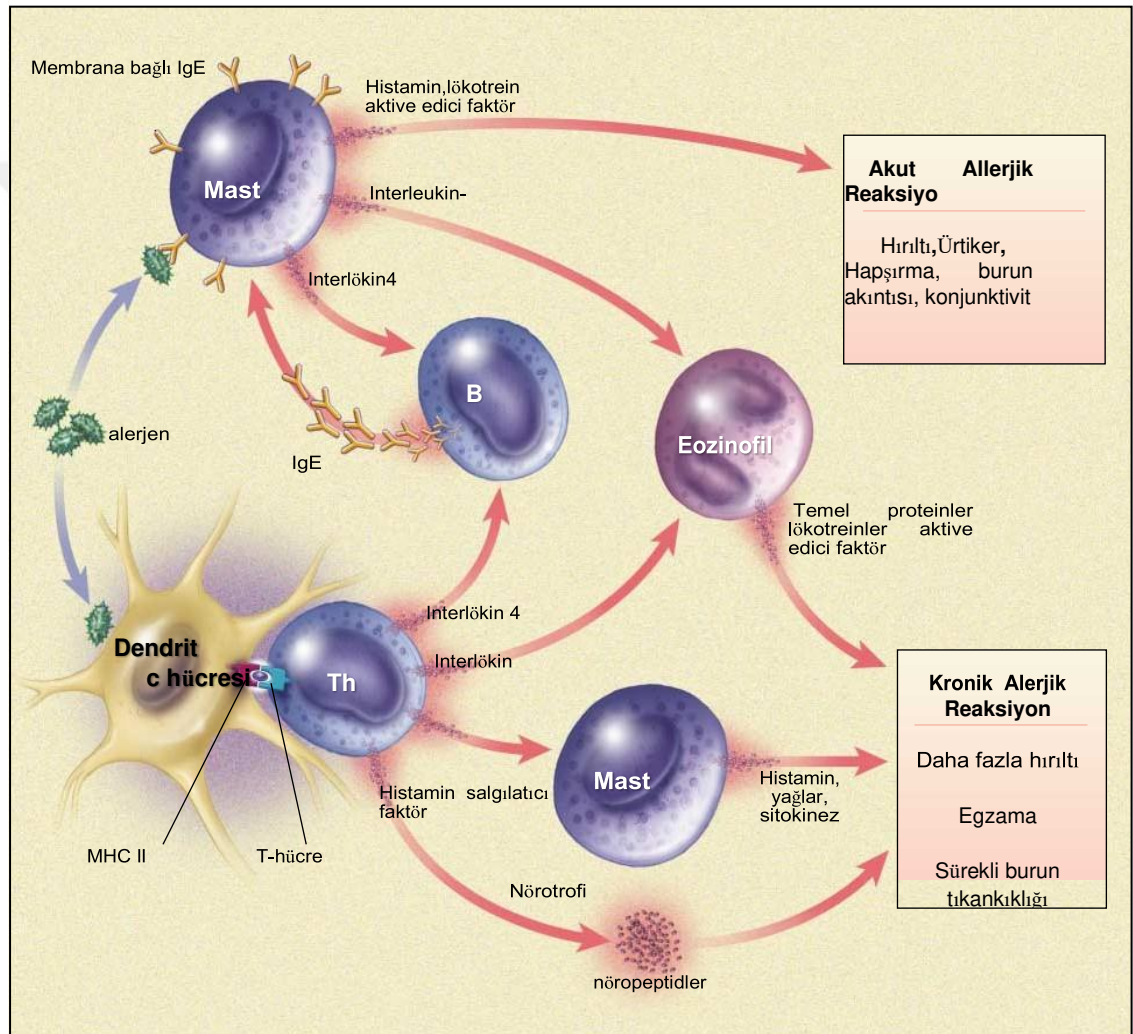
Kentsel topluluklarda alerjik bozuklukların artan prevalansına ilişkin bir dizi gözlemi açıklayan olası nedenlerden bazıları, çevre kirliliği, ev içi alerjenlerin artan konsantrasyonu, diyet ve çocukluk çağı enfeksiyonlarının azalması gibi çevresel faktörlerle ilgilidir. **Hijyen hipotezi**; bebeklik döneminin başlarında bakteriyel ve viral enfeksiyonların neden olduğu olası immünomodülasyona dayanır ve alerjik bir yanıt geliştirme şansını modifiye eder. Ancak çevresel faktörler alerjik hastalığın artışını tam olarak açıklamaz. Alerjik ebeveynlerin çocuklarının alerjik hastalık geliştirmede daha kritik olduğu bilindiğinden, son zamanlarda alerjik bozukluklarda genetik yatkınlık da kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Pincus, 2011).

Genetik çalışmalar geniş ailelerin bağlantı analizi dahil olmak üzere, alerjik hastalığa karşı artan duyarlılık sağlayabilen aday genleri içeren birkaç olası lokus tespit etmiştir. Alerjik bozuklukların, belirli popülasyonların genetik yatkınlığı ile belirli çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklanması beklenmedik bir sonuç değildir (Romagnani, 2004; Heinrich, 2004; Basehore, 2004; Platts-Mills, 2005).

Son yıllarda Batı Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri ve Avustralya'da atopik hastalık prevalansındaki belirgin artış, çevresel etkilerin önemini göstermektedir. Almanya'nın yeniden birleşmesinden sonra mevsimsel alerjik rinit ve astım insidansındaki değişim buna örnek verilebilir. Bu bozukluklar, yeniden birleşmeden önce Doğu Almanya'da Batı Almanya'dan daha az yaygındı, oysa yeniden birleşmeden bu yana, çocukluklarını Doğu Almanya'da geçiren çocuklar arasında atopi ve saman nezlesinin prevalansının arttığı gözlemlenmiştir (von Mutius, 1998). Bu olgu, batı yaşam tarzının yaygınlıktaki artışlardan sorumlu olma olasılığını ortaya çıkarmıştır.

Belki de Batı ülkelerinde gelişen bağışıklık sistemi, Th1 hücrelerini uyaran mikrobiyal antijenlerden yoksundur, çünkü ortam nispeten temizdir ve küçük hastalıklar için erken yaşamda antibiyotik kullanımı yaygındır (Rook, 1998).

Akut alerjik reaksiyonlar, mast hücrelerinden antijen kaynaklı histamin ve lipid mediyatörlerinin salınmasına bağlıdır. Deride ve üst solunum yollarında, bazofiller (gösterilmemiştir) de alerjik doku reaksiyonlarına katılabilir. Geç faz reaksiyonu da dahil olmak üzere kronik alerjik reaksiyonlar, eozinofillerin toplanması, histamin salgılayan faktörlerle mast hücresi ürünlerinin serbest bırakılması ve nörotrofinler ve nöropeptidleri içeren nörojenik inflamasyon dahil olmak üzere bir yol kombinasyonuna bağlı olabilir (Şekil 1.1) (MacDonald, 1995).



Şekil 1.1 Akut ve Kronik Alerjik Reaksiyon Yolakları

1.2. Alerjenlerin Biyolojik Aktivitesi

Enzimatik aktiviteye sahip proteinlerin alerjik reaksiyonları içermeye eğiliminde olduğu bir süredir bilinmektedir (Flindt, 1969; Pepys vd, 1969; Weill vd, 1971;

Dijkman vd, 1973; Pham and Mire, 1978; Baur vd, 1982; Quirce vd, 1992). Evrimsel bir perspektiften bakıldığında, uygun olmayan hücre dışı enzimatik aktivitenin bir bağışıklık tepkisini tetikleyebilmesi mantıklıdır, çünkü böyle bir tepkinin uygun olduğu enfeksiyon etkenlerinin varlığını yansıtır. Enzimatik aktivitenin varlığı, tip 2 immün yanıtın uygun olduğu organizmaların aktivitesini yansıtması muhtemel olduğunda, benzer şekilde, ani tip hipersensitivite reaksiyonunun ortaya çıkması şaşırtıcı değildir. Alerjenler çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Bazıları için, aktivitenin alerjenin etkinliğine doğrudan katkıda bulunabileceği mekanizmalar tanımlanmıştır. Belki de en iyi çalışılan aktivite, proteolitik aktiviteye sahip olduğu bilinen ev tozu akarı alerjeni Der p 1'dir. Bu aktivitenin bronş epitelinin geçirgenliğini arttırdığı ve böylece alerjenin alımına ve inflamatuvar sitokinlerin üretimine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Herbert vd, 1995). Der p 1 ayrıca bazı lökositlerin yüzeyinde eksprese edilen CD23'ü (FcεRII, düşük afiniteli IgE reseptörü) ve CD25'i (IL-2 reseptörü α zinciri) parçalayabilir (Hewitt vd., 1995; Schulz vd., 1995), bağışıklık tepkisinin düzensizliğine ve IgE üretiminin artmasına yol açar (Shakib vd, 1998). Diğer proteazlar, bu stratejilerin en azından bazılarını benzer etki için kullanabilir. Mast hücrelerinin protein alerjenleri tarafından IgE'den bağımsız bir şekilde doğrudan uyarılması, bir dizi farklı sistemde rapor edilmiştir, bu da dolaylı olarak *in vivo* ortamda alerjik bir yanıtı arttırabilir (Helm, 1994, Dudler vd., 1995; Emadi-Khiav and Pearce, 1996; Machado vd., 1996). Yine de, bu alerjenlerden birinin, fosfolipaz A2'nin (arı zehirindeki başlıca alerjen) alerjenliğinin, bir grup tarafından enzimatik olarak inaktif hale getiren mutasyonlardan etkilenmediği bulunmuştur (Wymann vd., 1998). Açıkça, bazı proteinler alerjenliklerini arttırabilecek biyolojik aktivitelere sahip olsalar da, bu tür aktivitenin görünüşte alakasız olduğu birçok durum vardır. Bazı alerjenler sadece enzim olabilir ve biyolojik aktiviteleri önemsiz olabilir. Bir hipoteze göre enzimlerin çalışma tarzından kaynaklanmaktadır; tipik olarak, substratları, proteinin yüzeyinden erişilebilen özel, genellikle hidrofobik ceplerde bağlarlar. Bu cepler alışılmadık antijenik potansiyele sahip olabilir ve belki de alerjeniteye katkıda bulunur. Substratın bu ceplere erişimi normal olarak enzimin esnemesine bağlıdır; böyle bir esneklik, belki de B hücresi reseptörlerinin veya IgE'nin bağlanmasını kolaylaştırarak alerjenliğe de katkıda bulunabilir (Russell, 2000).

Birçok alerjen, bazı benzerlikleri paylaşır, bu da alerjenitenin en azından kısmen birincil sekansla ilişkili olabileceğini düşündürür. Bununla birlikte, dahili peptit dizileri, T epitoplarının uzunluğu (10-15 amino asit kalıntısı uzunluğunda) dikkate alındığında, alerjen aileleri arasında genel bir homoloji ortaya çıkmaz (Gendel, 1998a; Gendel, 1998b).

Diğer bir yandan çok sayıda kanıt, değiştirilmiş T hücresi ligandlarının, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak T hücre tepkisinin polaritesini değiştirebileceğini göstermektedir (Windhagen vd, 1995; Sloan-Lancaster and Allen, 1996; Tsitoura vd., 1996; Vidal vd., 1996; Nicholson vd., 1998; Pingel vd., 1999).

Birçok protein alerjeni glikozillenir, bu da glikozil gruplarının alerjenitelerine katkıda bulunma olasılığını yükseltir. Bu, glikozilasyon paternlerinin doğal muadillerinden önemli ölçüde farklı olabileceği transgenik proteinlerin alerjenitesi düşünüldüğünde potansiyel olarak özellikle önemlidir (Jenkins vd., 1996). Bu tür farklılıklar, özellikle transgenler anormal derecede yüksek seviyelerde eksprese edildiğinde, normalde bulunmadıkları dokularda veya geniş tür bariyerleri aşıldığında olasıdır. Şaşırtıcı bir şekilde, protein glikozilasyonunun proteinlere karşı alerjik bir yanıtın indüklenmesiyle herhangi bir ilişkisi henüz kesin olarak gösterilmemiştir. Bununla birlikte, şeker gruplarının proteinlerin immünojenitesini ve alerjenliğini etkileyebileceği birçok potansiyel mekanizma mevcuttur.

Oligosakkaritler, ökaryotik hücrelerde sentezleri sırasında veya kısa bir süre sonra birçok proteine doğal olarak eklenir. Glikozilasyon, birincil amino asit sekansı içindeki yan glikosilasyon motiflerinin varlığına bağlı olarak, en yaygın olarak asparajin (N-bağlı) veya serin/treonin (O-bağlı) amino asit kalıntılarına oligosakkaritlerin kovalent bağlanmasını içerir (Marshall, 1972). Bu nedenle, ortaya çıkan glikoproteinlerin ayrılmaz bir parçasıdır ve fiziksel özelliklerini etkilerler. Bunlar, diğerlerinin yanı sıra, değişmiş stabilite, çözünürlük, hidrofobiklik ve elektrik yükü içerebilir. Bu değişikliklerin herhangi bir sayısı bir proteinin stabilitesini ve alımını etkileyebilir ve dolayısıyla antijenik ve alerjenik potansiyelini değiştirebilir. Birincil amino asit dizisinde bulunan kalıntıların kimliğini değiştirerek, glikozilasyon, bir proteinin yüzeyinde bulunan B hücresi epitoplarını değiştirebilir. Glikozile edilmiş epitopların genellikle çok iyi B-hücresi epitopları oluşturduğu bulunmuştur (Weber vd, 1987; Petersen vd., 1999), IgE'nin önemli bir oranı,

glikozile edilmiş epitoplara bağlanan bir glikoproteine karşı yönlendirilir. (Tretter vd., 1993; Batanero vd., 1994; Singh vd., 1999). Bu nedenle, bir proteinin, sensitize bir bireyde alerjik bir yanıtın (yani, mast hücrelerinin yüzeyinde çapraz bağlantı IgE) klinik etkisini ortaya çıkarma yeteneği, deglikozilasyon ile azaltılabilir (Batanero vd., 1994; Petersen vd., 1998).

1.3. Polen Alerjisi

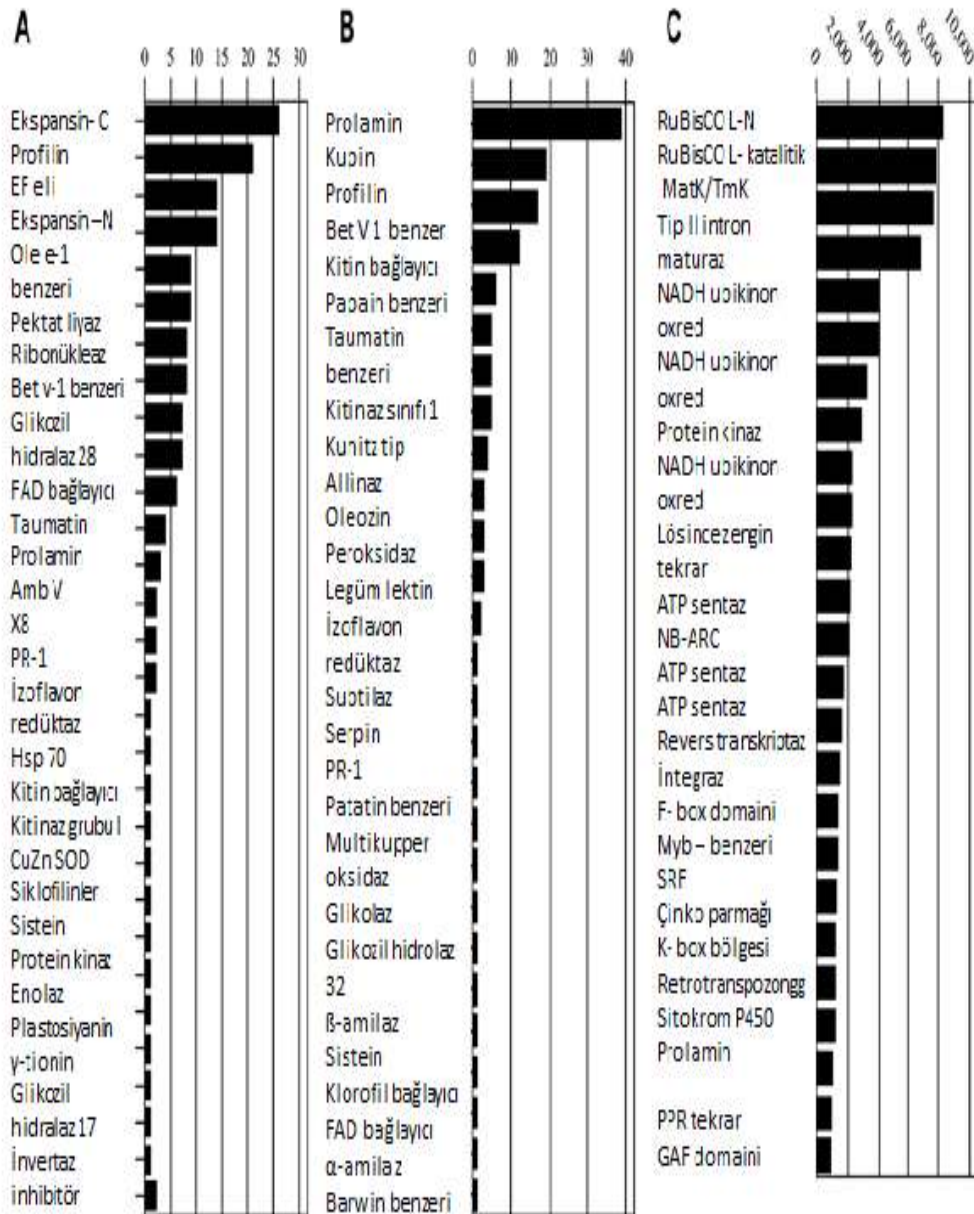
En önemli dış ortam alerjen kaynakları, ağaçlar, otlar ve yabancı otlar dahil olmak üzere anemofil (rüzgarla tozlaşan) bitkilerden elde edilen polen taneleridir. Anemofil bitkiler, 250.000'den fazla polen üreten türün yalnızca onda birini temsil eder. Mevsimine bağlı olarak, anemofil sporlar 100 tane/m^3 'ün üzerindeki konsantrasyonlara ulaşabilir, günlerce havada asılı kalabilir ve başlangıç noktalarından yüzlerce mil uzağa taşınabilir (Jae-Won , 2018). Anemofil bitkiler, döllenme şansını artırmak için, yüzlerce kilometreye yayılmaya izin veren iyi aerodinamik özelliklere sahip küçük, dehidre polen gibi karakteristik özellikler geliştirmişlerdir (Singh, 2021). Polende alerjenlerin varlığı ve bunların ekspresyon seviyeleri, bitki türlerine, olgunlaşma aşamasına, değişen iklime ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişebilir. İklim koşullarındaki değişiklikler nedeniyle, günlük ve mevsimsel yaygınlık gözlemleri çok önemli hale gelir çünkü bu şekilde elde edilen bilgiler saman nezlesi olan hastaların tedavisine doğrudan uygulanmaktadır. İklim değişikliği, çeşitli deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarda bildirildiği üzere, aeroallerjenleri ve özellikle bitki alerjenlerini etkiler (Sharma, 2010).

Polenler, aeroallerjenler olup alerjiye en çok sebep olan alerjen faktörler arasında yer alır. Her ağacın ve bitkinin disseminasyon döneminin farklı olmasından dolayı polenler neredeyse her mevsim atmosfere yayılır. Ve polen alerjisi olan bireyleri olumsuz yönde etkiler (Reid ve Gamble, 2009). Ülkemizde, eldeki verilere göre 9.376 doğal bitki türünün olduğu ve bunlardan %20'sinin alerjen özelliklere sahip olduğu da göz önünde bulundurulursa polenlerin önemi daha da artmaktadır (Sin vd. 2007).

Alerjik reaksiyonları tanımlanmış polen içeren 178 bitki türü, Allergome veri tabanında yer almaktadır. Bu türler 44 farklı aile ve 29 takıma aittir. Profilinler ekspanzinler ve EF hand domain içeren kalsiyum bağlayan proteinler esas (major)

polen alerjen ailelerini oluştururlar oysaki en çok bitki besin alerjeni kupin, profilin veya prolamin, ailelerine aittir. Ole e 1-benzeri, pektatliyz, ribonükleaz, Bet v 1 benzeri, glikozil hidrolaz 28, FAD bağlayan domain, thaumatin benzeri, prolamin, Amb V alerjen protein aileleri daha az sayıda alerjen protein içerirler. Allergome veritabanındaki alerjenler, Pfam protein ailesi veritabanıyla karşılaştırılmıştır. Polen (A, 29 aile) ve bitki gıdası (B, 27 aile) alerjenlerinin tüm ailelerindeki ve tüm tohumlu bitki proteinlerinin en bol bulunan 25 familyasındaki (C, toplam 2615 aile) dizi sayıları gösterilmiştir (şekil 1.2) (Rauder ve Breiteneder, 2006).





Şekil 1.2 Polen ve bitkisel besin alergen proteinlerinin dağılımı (Rauder ve Breiteneder, 2006).

1.4. *Tilia cordata*'nın Genel Özellikleri ve Alerjen Faktörleri

Tilia cordata'nın Taksonomisi

Alem: Plantae

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Aile: Tiliaceae

Cins: Tilia

Tür: *Tilia cordata*

Kuzey ılıman bölgelerden elliye yakın *Tilia* (ıhlamur, ıhlamur ağacı) türü bulunur. Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak dağılışı gösterir ve Meksika'nın güneyine bulunurlar. Kuzey Amerika kıtasında yedi tür bulunur. Avrupa türü genellikle sokak veya parklarda peyzaj amaçlı kullanılır. *T. cordata*, *Tilia*'nın en yaygın türüdür (Şekil 1.3). *T. cordata*, yaygın olarak yaprak döken, şekli çok simetrik, ana hatları piramitten oval olan ve yoğun koyu yeşil, yazın parlak yapraklıdır. Kalp şeklindeki yapraklar sonbaharda sarı veya sarı-yeşile döner. Polen taneleri farklıdır, 28–36 µm, tohum porları kalın, ağsı bir eksinde oluklara batmıştır. Ihlamur kolay hibritleşen bir türdür. 30m yüksekliğe (nadiren 37m) kadar uzanan yaklaşık 1m çapında silindirik gövdeli, kademeli olarak daralan ve yüksekliğinin üçte ikisine kadar dallanmayan bir ağaç türüdür (Pigott, 1991). Yaprakları basit, almalı genellikle dişli veya loblu, tabanı ise asimetriktir (Şekil.1.3). Çiçekleri iki eşeyli bazen tek eşeyli olabilir ve aktinomorf simetridir (Yıldız, 2010). Sıklıkla sokaklarda, parklarda ya da çevre kirliliği toleransı için refüjlerde kullanılır. Kurutulmuş yaprakları bitki çayı olarak kullanılır (Yıldız, 2010).



Şekil 1.3 *T. cordata* ([https:// katalog.marmaragroup.com](https://katalog.marmaragroup.com), 2020)



Şekil 1.4 *T. cordata* yaprak, meyve ve çiçekleri (Wikipedia Contributors, 2021)

Türkiye’de de 4 farklı ıhlamur ağacı türü bulunmaktadır. Yaz ıhlamuru (*T. platyphyllos*), (Kafkas ıhlamuru (*Tilia rubra*), gümüşü ıhlamur (*Tilia tomentosa*), küçük yapraklı ıhlamur, (*Tilia cordata*) türleridir (Davis, 1967). Ihlamur türleri aromatik yağlar, uçucu yağlar ve benzeri sekonder metabolitler bakımından zengin olması sebebiyle tıp, eczacılık, gıda, kozmetik ve parfümeri gibi alanlarda büyük öneme sahiptir (Başer vd., 1993). *T. cordata* ve *Caucasian lime* ıhlamurunun

hibritleri olan *Crimean lime*, *T. xeuchlara*'nın ağaçlarının altında uzanan bal arılarında narkotik etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Ihlamur ağaçları arı yetiştiricileri için ihlamurun nektarı ve yüksek değerli özütünden dolayı oldukça değerli bir ağaçtır. Polen disseminasyonu, Haziran'dan Temmuz'a kadar devam eder. Bazen Ağustos'a kadar da devam edebilir. Polinasyonu sağlayanların başında böcekler gelmektedir. Arılar ve sürekli uçan böcekler polenlerin geniş alanlara yayılmasına neden olurlar. Ayrıca *T. cordata* ekstraktının normal murin lenfositleri ve lenfoma hücre hattının aktivitesini antiproliferatif edici etkisi olduğu düşünülmektedir (Pigott, 2010).

Portekiz'deki alerjik bir popülasyonda aeroalerjen duyarlılığını değerlendiren bir çalışma, yüksek polen sayılarının, küçük çocuklarda bile meydana gelen erken duyarlılığı açıklayabileceğini bulmuştur (Loureiro, 2005). Ihlamur ağacının, en temsili aeroalerjenlerden biri olduğu bulunmuştur ve 557 pediatrik (15 yaşından küçük) hastanın %11,4'ünde duyarlılaşma ile sonuçlanmıştır (Yazıcıoğlu, 2004).

Türkiyede rinit ve astımlı çocukların %5,5'i, Portekiz'deki alerjik çocukların %11,4'ünde *Tilia* hassasiyeti görülmüştür. Türkiyedeki yetişkinlerin %42,5'inde *T. cordata*'nın alerjik semptomları arasında öksürük, rinokonjonktivit, alerjik kontakt dermatit bulguları tanımlanmıştır (Weber, 2014).

T. cordata polen alerjisi ile ilgili literatür taramalarında 2001 yılına kadar bir çalışmaya rastlanmamıştır. 2001 yılında Mur ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada alerjik rahatsızlıkla kliniğe başvuran bir kadında *T. cordata*'ya karşı alerjik reaksiyon gösterdiğini rapor etmişlerdir (Mur vd., 2001). Hastanın evinin yakınlarında bulunan *T. cordata*'nın çiçeklenme döneminde (Haziran-Temmuz) bu ağacın polenlerine karşı göz, kulak, burun, farinkste kaşıntı, hapsirme ve gece gelen öksürük nöbeti bulgularını raporda belirtmişlerdir. Yaptıkları laboratuvar incelemelerinde ise hastanın IgE seviyesini yüksek ve *T. cordata* polen ekstresine karşı yapılan deri prick testini (SPT) (%5 w/v) pozitif olarak tespit etmişlerdir.

1.5. Polen Morfolojisi

Polen, kozalaklı ağaçların veya diğer gymnospermilerin erkek konilerindeki mikrosporanjiyada veya bir anjiyosperm çiçeğinin anterlerinde üretilir. Polen tanecikleri, türe özgü çok çeşitli şekil, boyut ve yüzey işaretlerine sahiptir. En küçük

polen taneciği (*Myosotis spp.*), yaklaşık 6 µm çapındadır. Rüzgarla taşınan polen taneleri yaklaşık 90-100 µm kadar büyük olabilir (Tablo 1.2) (Pleasant vd., 2001). Alerjik hastalıkları teşhis ve tedavi etmek için kullanılan alerjen özütlerinin üretiminde kaynak malzeme olarak kullanıldığından, aktif bir farmasötik bileşen olarak kabul edilir. Bu nedenle, polen alerjen özütlerinin üretilmesine yönelik üretim süreçleri ve bu özütlerin kalitesi, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Biyolojik Değerlendirme ve Araştırma Merkezi (CBER) tarafından düzenlenir (Codina, 2016).

Tablo 1.2 Polen taneciklerinin boyutlarına göre kategorize edilmesi (Kremp, 1965)

Boyut (mm)	Kategori
<10	çok küçük polenler (<i>Myosotis</i>)
10–25	küçük polenler (<i>Salix</i>)
25–50	orta polenler (<i>Quercus</i>)
50–100	büyük polenler (<i>Zea</i>)
100–200	çok büyük polenler (<i>Cucurbita</i>)
>200	aşırı büyük (giant) polenler (<i>Mirabilis</i>)

Polen çalışmaları taneciklerin tüm yapısal özelliklerini ve dekoratif yönlerini kapsamalıdır. Polen morfolojisi çalışmalarında ışık mikroskopu ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılması ve bu polen taneciklerinin genel yapısını (örneğin; şekli, ölçüsü, apertür numarası ve bölgesi) görselleştirmek için önemlidir (Halbritter vd., 2018).

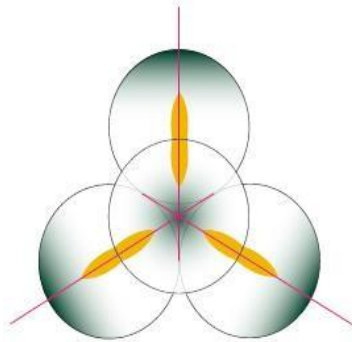
Polen taneleri, gelişimin erken aşamalarında (anter duvarı gelişimi, mikrosporogenez ve mikrogametogenez) daha sonraki aşamalarından (polen olgunlaşması ve anter ayrışması) veya progamik faz sırasından (polen hidrasyonu, polen tüpünün çimlenmesi, büyümesi ve yönlendirilmesi) daha hassastır. Olgunlaşma sırasında polen taneleri, bir anter ayrışmasından önce veya sonra çeşitli derecelerde hücresel dehidrasyona uğrar. Polen taneciklerinin su içeriği %40'a düşer ve polen alıcıları

stigmaya inene kadar fizyolojik olarak uykuda kalır (Iron, 2012). Böylece, dağılmaya hazır polen, dış ortamda uzun vadeli canlılığı sağlamak için azaltılmış bir metabolik aktiviteye sahiptir. Biselüler polen genellikle triselüler polenden daha fazla dehidredir ve metabolik olarak daha az aktiftir. Polenlerin kurumasında sıcaklık değişimlerinin güçlü bir etkisi vardır. Endoplazmik retikulum yığımları, ısı stresi altındaki polende büyük ölçüde ayrışır ve sonuç olarak protein işlenmesini ve salgılanmasını etkiler (Ciampolini, 1990).

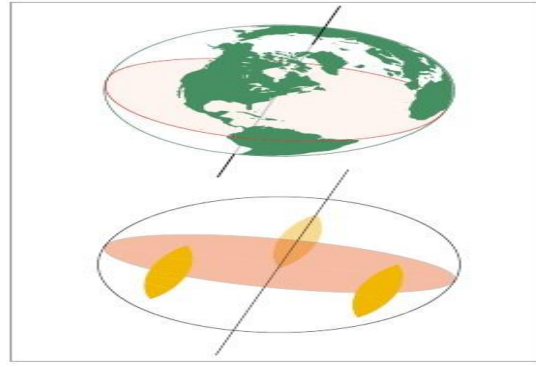
Polen duvarının birincil alt bölümü, dış ekzin ve iç intin tabakasından oluşur. Ekzin, son zamanlarda karotenoid polimerizasyonu ile üretildiği şeklinde yorumlanan oldukça dirençli bir polimer olan sporopolleninden oluşur (Brooks ve Shaw, 1968).

Polen şekli ve apertür konumu doğrudan polen polaritesiyle ilişkilidir. Polarite, mayotik tetraddaki mikrosporun uzamsal yönelimi ile belirlenir ve tetrad aşamasında incelenebilir.

Her mikrospor polenin kutup eksenini, tetrad merkezine doğru yönlendirilmiş proksimal kutuptan mikrospor polenin uzak kutbuna doğru uzanır (Şekil 1.5). Ekvator düzlemi, mikrosporun merkezinde kutup eksenine dik olarak bulunur (Şekil 1.6). Ekvator düzlem mikrosporu/poleni, dünyanın kuzey ve güney yarımküresine benzer proksimal ve distal iki parçaya böler.



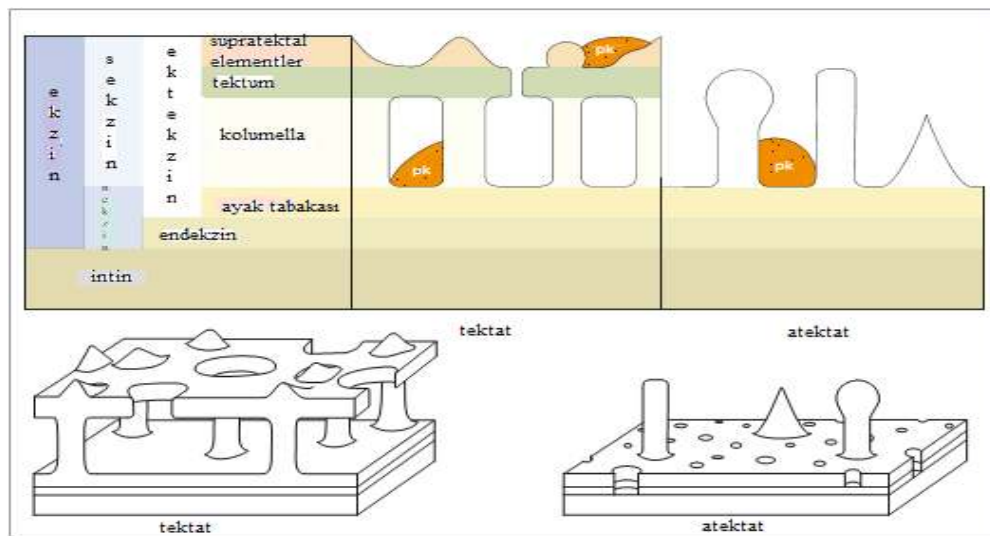
Şekil 1.5: Tetrad yapısı (Halbritter, vd., 2009)



Şekil 1.6 Polen ekvatoryal düzlemi (Halbritter, vd., 2009)

1.6. Polen Duvarı (Sporoderm)

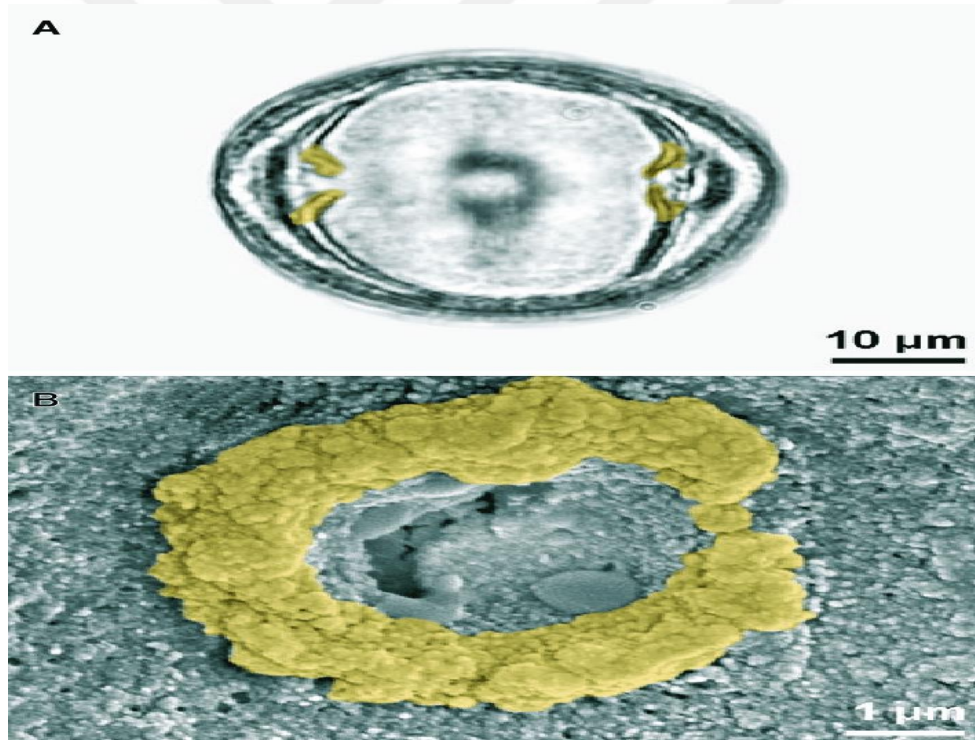
Tohumlu bitkilerde sporoderm genellikle iki ana tabakadan oluşur: dış kısım ekzin, iç kısım intin. Ekzin genel olarak sporopolleninlerden oluşur ve bu sporopolleninler asetolizis ve parçalanmaya dayanklı biyopolimerlerdir. İntin ise genellikle pektin ve selulozdan oluşur. Ekzin kendi içinde 2 tabakaya ayrılabilir: iç kısımdaki “endekzin” dış kısımdaki ise ektekin olarak adlandırılır. Tektat polende ektekin genellikle bir bazal ayak, bir infratektum (örneğin, columellae) ve bir tektumdan oluşurken, endekzin ise esas olarak yapılandırılmamış bir katmandır. Bu temel yapıdan bir çok sapma vardır: katmanlar kalınlaştırılmış, değişken şekilde yapılandırılmış veya eksik olabilir. Polen tanesinde tektum bulunmadığında buna atektat denir. Apertural bölgelerde polen duvarı genellikle farklı bir ekzin yapısı ile karakterize edilir.



Şekil 1.7 Polen duvarı tabakalaşması (Halbritter, vd., 2009).

1.7. Angiosperm Polen Duvarı

Angiospermelerde ektexin genel olarak infratektum, tektum ve ayak tabakasından oluşmaktadır. Bununla birlikte dış katman, tektum ve supratektal elemanlarla kaplı olabilir. İnfratektumun altı kısmı kolumellat granulardır (ikinci bir kolumella tabakası bir internal tektum oluşturabilir). Ayak tabakası ise sürekli olabilir, kesintili olabilir veya olmayabilir. Endekzin, sürekli veya süreksiz, süngerimsi veya kompakt, yalnızca apertürlerde bulunabilir ya da hiç bulunmayabilir. Duvar kalınlığındaki sapmalar için; annulus, tektus, tenuitas ve kosta (neksin kalınlaşması / endoapertür sınırındaki endeksin) gibi bazı özel terimler kullanılır (Şekil 1.8) (Halbritter, 2009).

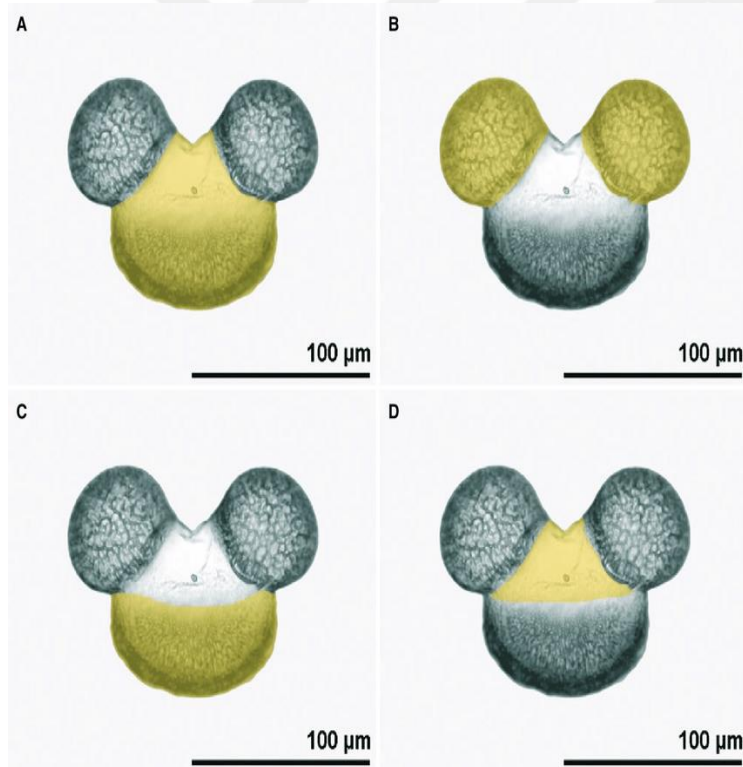


Şekil 1.8 A. kosta polen B. Duvarın iç tarafında endoapertür etrafındaki kalınlaşmanın görünümü (Halbritter, 2009)

1.8. Gymnosperm Polen Duvarı

Gymnospermiler (açık tohumlu) bitkiler Ginko, Sikadlar, Coniferler (kozalaklı ağaçlar) ve Gnetales'den oluşur. Gymnosperm polen duvarının temel tabakalaşması (ektekin, endekzin ve intin) angiosperm polen duvarı ile aynıdır. Fakat gymnosperm polen duvarının angiospermden ayıran 2 farklı noktası vardır: birincisi olgun polende bir lamellat endekzin bulundurarak, ikincisi ise infraktum asla kolumellat değildir. İnfratektum da alveolat veya granulardır ancak asla kolumellat değildir (Van Campo, 1973).

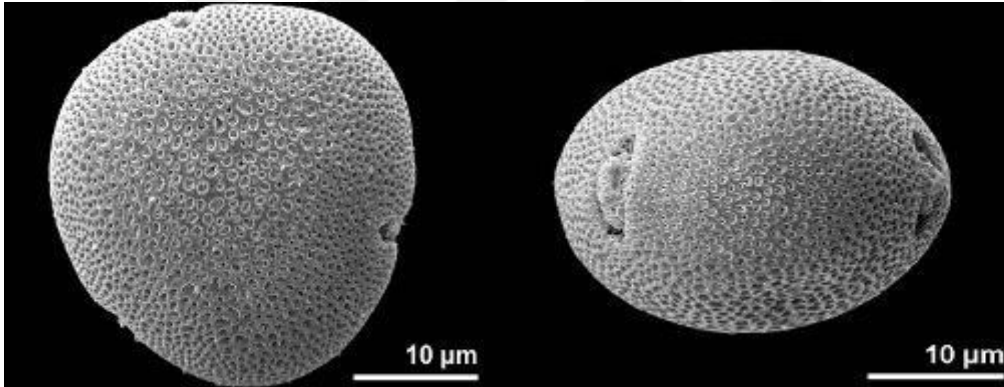
Saklat poleni için özel bir terminoloji kullanılır (örneğin; Pinaceae ve Podocarpaceae). Saccus, alveolat infratektum ile bir hava kesesi oluşturan ekzinöz bir genişlemedir. Corpus, saklat polen tanesinin merkezi gövdesidir. Kappa, korpusun kalın duvarlı proksimal yüzüdür. İnce duvarlı distal yüzü ise leptoma olarak adlandırılmıştır (Şekil 1.9) (Van Campo, 1973).



Şekil 1.9: Gymnosperm saklat poleninde terminoloji A) Corpus B) Sacci C) Kappa D) Leptoma

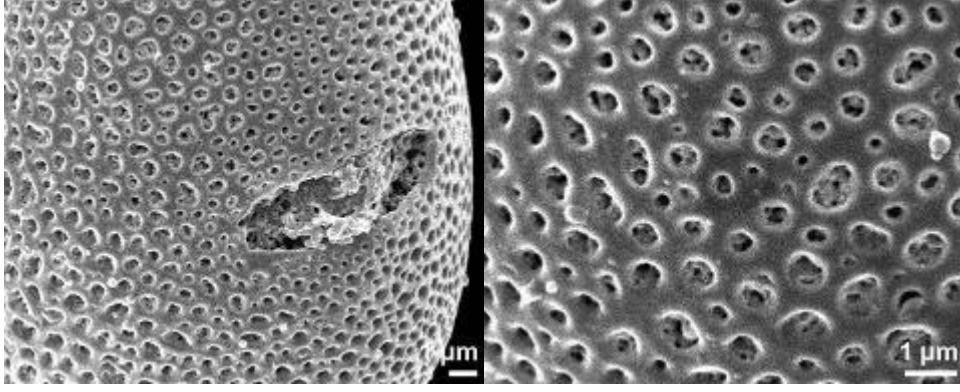
1.9. *Tilia Cordata* 'nın Polen Morfolojisi

T. cordata polenlerinin ekvator çapı 25-37 μm ve yuvarlanmış üçgene benzer bir görünüme sahiptir (Şekil 1.13). Polen taneleri trikolporat, porlar düzleşmiş alanın ortası boyunca uzanırlar. Oluklar kısa elips, 10-16 μm uzunluğunda ortalama 3-5 μm eninde ve düzensiz sınırlara sahiptirler (Şekil 1.10). Sekzin (ekzin dış katmanı) ve nekzin (ekzin iç katmanı) benzer kalınlıkta olup, kolpi yanındaki yaklaşık 4-7 μm kalınlığındaki (nekzin hariç), totalde yaklaşık 3 μm kadardır. İntin apertürlerin altında ince bir yapıdadır. Duvar yapısı, dallanmış mikropilanın kolumellasıyla birlikte tektattır. Yüzey yapısı düzensiz mikoretikülatır (Weber, 2014). Polen duvar yapısından morfolojik ve anatomik olarak önemli ölçüde farklılık gösteren kısım ise **apertür** olarak adlandırılmıştır (Şekil 1.11). Apertür genellikle bitkinin çimlenmesinde rol oynar ve sussuz ortamlarda kapanarak su kaybının önüne geçerler (Halbritter, 2009).



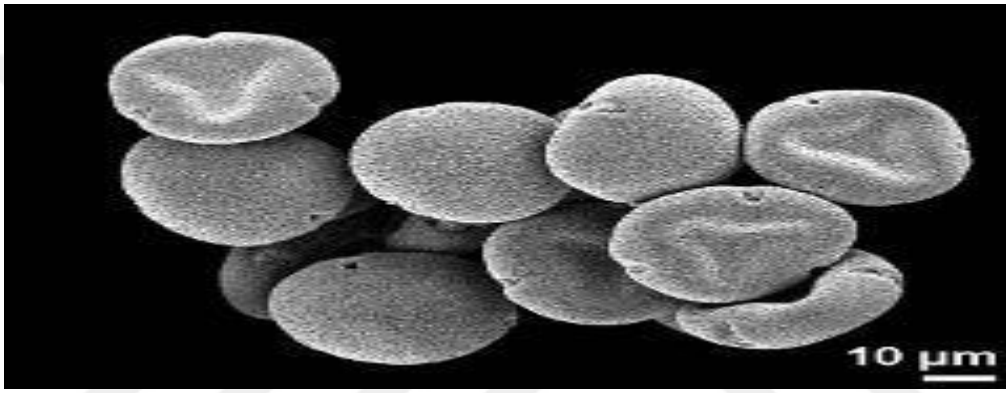
Şekil 1.10 (A) Polar görünüm

(B) ekvatorial görünüm



Şekil 1.11 (A) Apertür

(B) ekzin yüzeyi



Şekil 1.12 Kuru polen taneleri (paldat.org, 2020)



Şekil 1.13 *Tilia cordata* 'ya ait mikroskop görüntüleri (paldat.org, 2020)

1.10. Polinasyon (tozlaşma)

Polen taneleri, döllenmeyi sağlamak için gereken erkek gametleri içerir. Polen tanelerinin dişi üreme yapısına (kapalı tohumlularda pistil) aktarılmasına **tozlaşma** denir. Anterin ayrışması ve dağılması için uygun koşulları bekleyen olgun polen taneleri, normalde polen tüplerinin içinden büyüdüğü ve stigmanın uzunluğu boyunca aşağıdaki ovüle doğru geçişlerini geliştirdiği gözeneklere sahiptir. Bu aktarıma rüzgar aracılık edebilir, bu durumda bitki **anemofil** olarak tanımlanır. Anemofil bitkiler tipik olarak bazen hava keseli büyük miktarlarda çok hafif polen taneleri üretir. Çiçeksiz tohumlu bitkiler, karakteristik olarak anemofildir. Anemofil çiçekli bitkiler genellikle göze çarpmayan çiçeklere sahiptir. **Entomofil** (böcek seven) bitkiler, çiçeklerine çektiği böcek tozlayıcıları tarafından dağıtılmak üzere nispeten ağır, yapışkan ve protein açısından zengin polen üretirler. Pek çok böcek ve bazı akarlar polenle beslenmek için uzmanlaşmıştır ve bunlara **palinivor** denir. Çiçeklenmeyen tohumlu bitkilerde polen, mikropilin altında, yumurtanın iç kısımlarının altında bulunan polen odasında filizlenir. Gelişmekte olan sperm hücresine besin sağlamak için çekirdek içinde büyüyen bir polen tüpü üretilir. Bu arada, tüp hücresinin çekirdeği ve iki sperm hücresi oluşturmak için bölünen üretici çekirdek de tüpün içine geçmiştir. Sperm hücreleri polen tüpünün ucunda hedeflerine taşınır. Polen tüpünün büyümesi sırasında ortaya çıkan çift sarmallı DNA kırılmaları, bir sonraki bitki nesline aktarılacak erkek genomik bilgisini taşıyan üretici hücrede verimli bir şekilde onarılıyor gibi görünmektedir (Hirano, 2013).

1.11. Polen Alerjisinde Tanı

Polen alerjisinin teşhisi, hastanın klinik geçmişi ve fiziki muayene ile başlar. Klinik geçmiş, tanımlanabilir ve ilgili bir alerjen maruziyetiyle geçici ilişki içinde olan alerjik semptomları tanımladığında, IgE antikor duyarlılığı *in vivo* cilt testleri (prick veya intradermal) veya *in vitro* kan testleri (alerjene özgü IgE antikor serolojik testleri) ile doğrulanmıştır (Jae-Won, 2018). Bireyin duyarlılık öyküsü ile bu birincil tanısal testler arasında bir uyumsuzluk varsa, ikincil bir provokasyon testi (burun testleri, bronşiyal testler) öyküye dayalı tanının doğruluğuna karar verebilir. Alerji testleri semptomlara, çevresel ve mesleki maruziyetlere, yaşa ve hatta hobiye göre seçilir. Tüm sonuçlar daha sonra hastanın tıbbi geçmişi ile bağlantılı olarak yorumlanır. Alerjenlerin nedenini belirlemek için deri testi ve kan testi olmak üzere

iki tür test vardır. Hiçbir test tek başına bir alerjiyi teşhis edemez. Hem kan hem de deri alerjisi testleri, bir hastanın polenler ve toz akarları gibi yaygın solunan maddelere veya diğer maddelere karşı duyarlılığını tespit edebilir. Genel olarak deri testi, alerji uzmanları tarafından kullanılan en doğru ve tercih edilen yöntemdir. Şiddetli deri döküntüleri gibi bazı özel durumlarda veya deri testinin yorumlanmasını engelleyen bir ilacın kullanılmasını durdurmak mümkün değilse, alerji kan testleri de kullanılabilir. Deri ve kan alerji testlerinin sonuçları net değilse veya hastanın tıbbi geçmişi ile tutarsızsa, alerjenleri bulmaya yönelik sorgulama testleri, tıbbi geçmişte toplanan bilgileri doğrulayan doğru ve güvenilir sonuçlar vermek açısından değerlidir. Alerjik hastalıklarından tanısında deri prick testi, intradermal deri testi ve serolojik testler kullanılır. Bu testler arasında deri testleri serolojik testlere göre daha hassastır. Ve daha güvenilir sonuçlar verir (Jae-Won, 2018).

1.11.1 Skin Prick Test

Prick veya scratch (çizik/çizme) testlerde, olası alerjenden deriye küçük bir damla damlatılır. Daha sonra alerjen damlatılan nokta bir iğne ile hafifçe delinir veya çizilir. Prick testi, cihazın ucunun epidermise yaklaşık 45° 'lik bir açıyla bir damla ekstraktın içinden sokulmasıyla gerçekleştirilir; uç daha sonra kaldırılır ve epidermiste küçük, geçici bir yırtık oluşturur. Prick testi hipodermik iğnelerle yapılabilir. Scratch testler daha zayıf tekrarlanabilirlik ve daha fazla depigmente alan bırakma olasılığı nedeniyle yakın zaman önce artık uygulanmamaya başlanmıştır (Vanselow, 1967). Damlatılan alerjene karşı hassasiyet varsa 15 dk içinde kızarıklık, şişme ve kaşıntı başlayacaktır. Ayrıca arı kovanına benzer bir kabarıklık veya iz de görülebilir. Bu kabarık alan ne kadar genişse alerjene karşı alerjik olma olasılığı doğru orantılıdır.

Deri testi, bir seansta birden fazla hassasiyeti test etme yeteneği nedeniyle IgE aracılı hassasiyetin *in vivo* tespiti için tercih edilen yöntemdir. Pozitif deri testleri, astım ve alerjik rinitli hastaların çoğunda mevcuttur, ancak semptomları olmayan kişilerde de yaygındır.

Bu nedenle, deri testinin pozitif olması klinik alerji tanısı koymak için yeterli değildir. Bazı hastalarda tipik alerjik rinit semptomları vardır, ancak cilt ve ilgili alerjenler için *in vitro* testler negatiftir.

Prick testlerle ilgili bilinmesi önemli olan;

- Pozitif bir deri testi sonucu tek başına, bir alerjiyi teşhis etmek için yeterli değildir.
- Pozitif bir deri testi alerjinin şiddetini belirlemede yardımcı olamaz.

Negatif bir deri testi her zaman alerjik olmama anlamına gelmez (Jae-Won, 2018).

Diğer bir taraftan SPT avantajlarını değerlendirecek olursak;

- Bir çok alerji türüne karşı uygulanabilir bir yöntemdir.
- Bazı durumlarda alerjen tespitinde en doğru ve en ucuz yöntem olabilir (Vanselow, 1967).
- Skin Prick testler serolojik testlere göre daha hassastır. Ve daha güvenilir sonuçlar verir (Jae-Won, 2018).

1.11.2 İntradermal Testler

İntradermal testler, deri altındaki dış tabakaya çok az miktarda alerjen enjekte edilmesiyle yapılır. Bu test, deri prick testi sonuçları negatifse ancak yine de hastanın alerji olduğundan şüpheleniyorsa kullanılabilir.

1.11.3 Serolojik testler

Deri testleri, serolojik testlerden daha hassastır, ancak bazı durumlarda alerjileri teşhis etmek için bir kan testi kullanılabilir. Hastanın cildi çok hassas veya bir cilt rahatsızlığı varsa, alerji testi sonuçlarına etki edecek bir ilaç kullanılıyorsa, daha önce bir alerjene karşı çok hassas ise ve daha fazla maruz kalmaktan kaçınması gerekiyorsa serolojik testler yapılabilir. Total IgE serumu, alerjik hastalıklar için tanısal bir belirteç olarak kullanılır. Bununla birlikte atopik ve non atopik popülasyonlar arasında total IgE serum seviyelerindeki geniş örtüşme, alerjik hastalıkların teşhisi çalışmasında en önemli tek laboratuvar analiti olan alerjene özgü IgE'nin yerini almasına neden olmuştur. Serolojik testlerin sonuçlanması birkaç gün sürebilir. Hangi tür alerji testi yapılırsa yapılsın bu teste "Spesifik IgE (sIgE) Kan Testi" denir (Genellikle RAST veya ImmunoCAP testi olarak anılır). Bu test, yanlış pozitif sonuç oranlarının yüksek olması nedeniyle iyi bir tarama testi değildir. Bir alerjinin ne kadar şiddetli olduğunu belirleyebilecek bir test henüz yoktur.

Radyoallergosorbent testi (RAST), insan serumunda alerjene özgü IgE antikorlarının tespiti için 1968 yılında geliştirilen ilk testtir (Wide, 1967). RAST, rekabetçi olmayan, heterojen (ayırma aşaması dahil), katı fazlı bir immünoradyometriktir.

Son zamanlarda testlerin otomasyonu ve reaktif kalitesinde büyük gelişmeler olmuştur. Örneğin, alerjen ekstraktlarının ve özellikle alergosorbentlerin hazırlanmasında kullanılan bileşen alerjenlerin sayısı ve kalitesi, yeni ekstraksiyon ve kalite kontrol yöntemleri kullanılarak yapılan kapsamlı araştırmalar sonucunda artmıştır.

1.11.4 Nazal Provakasyon Testleri

Nazal provakasyon testleri (NPT) alerjenin veya mediatörün doğrudan burun içine verilmesiyle yapılır. NPT, doğal olarak gelişen alerjiyi *in vitro* ortamda taklit ederek alerjenlerin rinitteki rolünü göstermede en iyi deneysel yöntem olarak kabul edilir. NPT klinik veya bilimsel araştırma amacı ile kullanılabilir (Jae-Won, 2018).

1.12. Alerji Tedavi Yöntemleri

1.12.1 Alerjen Immunoterapi ve Rekombinant DNA

Alerjene özgü immünoterapi, deri altına enjeksiyon veya alerjen ekstre dil altı uygulamasıyla (sublingual) gerçekleştirilen, tip I alerjik hastalıklara karşı etkili bir tedavidir. Deri altı immunoterapisi, bitki aeroalerjenlerine bağlı oluşan astıma karşı iyi sonuçlar vermesine rağmen polen tipik olarak rinit ve konjonktivit semptomları oluşturur (Scheibelhofer vd., 2018). Sublingual immunoterapi (SLIT), deri altı immunoterapiye (SCIT) göre hastaları desensitize etmede daha güvenilir bir yöntemdir. Başarılı SLIT' in immünolojik mekanizmaları büyük ölçüde SCIT' ninkilere benzer. Bir dizi büyük klinik çalışma, SLIT'in klinik olarak etkili olduğunu, alerjik rinit ve astım semptomlarını iyileştirdiğini göstermiştir (Scheibelhofer vd., 2018). Dendritik hücreler, toleransı indüklemekte önemli bir rol oynar. Bu noktada üç tolerans aşaması tanımlanmıştır: mast hücrelerinin ve bazofillerin erken toleransı, ardından T hücresi toleransı (T hücresi anerjisi) ve T helper 2 hücresinden T helper1 hücresine geçiş ve sonunda B hücresi toleransı (B

hücresi baskılanması). İnsanlarda tolerans, alerjene özgü IgG4 indüksiyonu, salgılayıcı immünoglobülin antikorlarının indüksiyonu, yabancı proteinleri bağlayan ve lokal enflamasyona neden olmadan vücuda girmelerini önleyen çeşitli mekanizmalarla indüklenebilir (Scheibelhofer vd., 2018). Bununla birlikte, uzun süre ve yan etkiler nedeniyle, hastaların sadece küçük bir kısmı bu tedaviyi almaya karar verir. Alternatif olarak, hasta sayısındaki artışı durdurmak için küçük çocuklarda erken profilaktik müdahale önerilmiştir.

Alerjenleri kodlayan plazmid DNA ve mRNA aşılarının, alerjik Th 2 -tarafı reaksiyonları modüle eden veya bunlara karşı koyan Th 1 yanı sıra T düzenleyici yanıtları indüklediği gösterilmiştir. Ham özütlerin aksine, genetik aşılar alerjeni yüksek saflıkta sağlar (Scheibelhofer vd., 2018). Plazmit DNA veya mRNA aşıları ile bağışıklık kazanmayı izleyen süreçler, viral enfeksiyonlarla bağlantılı olanlara çok benzer; yani, transfekte hücreler içinde kodlanan proteinler kopyalanır, çevrilir ve bağışıklık sistemine sunulur. Bu nedenle, bu aşılarda özellikle hücre aracılı bağışıklık yoluyla viral enfeksiyonlar ve tümörlerle savaşmak için uygun olabileceği varsayımı açıktı. Aslında, hayvan modellerinde yapılan ilk çalışmalar, DNA aşılarının güçlü sitotoksik T-hücresi tepkileri ortaya çıkarmadaki etkinliğini kanıtlanmıştır. Klinik olarak ilgili alerjenleri kodlayan DNA aşılarının anti-alerjik potansiyelini araştıran ilk çalışmalar, huş ağacı ve ev tozu akarından gelen ana alerjenleri kodlayan yapılarla gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, hayvan modellerinde alerjen kodlayan plazmid DNA ile aşılanmanın bizzat Th1-tarafı bir tepkiye neden olduğu, bununla birlikte IgE üretiminden kaçındığı ve hatta terapötik bir ortamda yerleşik bir alerjik Th2 reaksiyonuna karşı koyabildiği kanıtlanmıştır (Scheibelhofer vd., 2018).

Şiddetli polen alerjisi semptomları immünoterapi ile hafifletilebilir. Alerjen immünoterapi, hem alerjik rinit hem de alerjik astım için etkili bir tedavi yöntemidir. Klinik etkinlik, yeterli dozda ekstraktların uygulanmasını gerektirir; kontrollü çalışmalarda birçok alerjen için etkili dozlar belirlenmiştir. İmmünoterapi, alerjenlere karşı hem yardımcı T hücre alt kümesi Th1 hem de Th2 yanıtını azaltan regülatör T hücrelerinde erken ve geçici bir artışa neden olur. İmmünoterapi, hastalık modifikasyonunu indükler, yeni duyarlılıkları azaltır, rinitten astıma, ilerlemeyi azaltır ve kesildikten sonra yıllarca devam eden klinik iyileşme ile sonuçlanır. Alerjen özütlerinde ve bunların uygulama yollarında yapılan değişikliklerin aktif

araştırması, rahatsızlığı azaltmak ve immünoterapinin güvenliğini artırmak için immunoterapi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. İmmünoterapi türü, zamanla verilen SCIT veya SLIT içerir. Bunlar, bağışıklık sistemini belirli bir alerjene uyarlamaya yöneliktir. Bazı hastalar için alerji semptomları 1-3 yıl içinde sonsuza kadar kaybolur (Jae-Won, 2018).

Rekombinant DNA; moleküler biyoloji alanındaki gelişmeleri takiben ortaya  ık mış ve alerji alanına yansıması da alerjenlerin bu teknikle rekombinantlarının üretilmesine  nc  olmuştur. Bu teknoloji ile birlikte standart bir kalitede rekombinant alerjen  retilabilmektedir (Mothes vd., 2006; Song vd., 2008; Assarehzadegan vd., 2011; Zarinhadideh vd., 2015). Doğal alerjen ekstrelerinin tanı ve tedavide oluşturduğu sorunlara oranla rekombinant olarak üretilen alerjenlerin daha iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir (Valenta ve Nideberger, 2007). Fakat rekombinant DNA teknolojisinin yüksek maliyetli olması ve elde edilen ekstradaki alerjen proteinin spesifik olması doğal ekstrelere karşı dezavantajdır. Doğal ekstrelerde o polene ait farklı alerjen proteinler bulunması o alerjene karşı tanı ve tedavide önemli rol oynamaktadır.

BÖLÜM II

Kaynak Özetleri

Geçmişten bugüne kadar yapılan bilimsel çalışmalarda çeşitli kaynaklardan önemli alerjen proteinleri izole edilmiş, yapı ve fonksiyonlarına göre farklı protein gruplarında sınıflandırılmıştır. Bunlar arasında en çok bilinen alerjenler; depo proteinleri, serum albuminler, tropomiyosinler, lipokalinler, patogeneze ilişkili protein ailesi 10 (PR-10, “pathogenesis-related protein family 10”) ailesi proteinleri, parvalbuminler, profilinler, kalsiyum bağlayan proteinler ve non spesifik lipid transfer proteinleridir (Sastre, 2010).

İklim değişikliği insan sağlığını etkilemekte; kardiyovasküler, bulaşıcı ve alerjik hastalıklara neden olmaktadır. Bu değişikliğin neden olduğu hastalıklar arasında alerji ön saflarda yer almaktadır. Araştırmalar, alerjik solunum yolu hastalıklarının iklim değişikliğinden etkilendiğini ve iklim değişikliğinin küresel sağlık için bir tehdit olarak kabul edilebileceğini, gıda kaynaklarını, su ve hava kalitesini ve iklimi etkilediğini göstermektedir. Astım gibi alerjik solunum yolu hastalıkları ile iklim değişikliği ve çevre kirliliği arasında doğru bir orantının olduğunu epidemiyolojik çalışmalar ve deneyler desteklemektedir. Artan CO₂ konsantrasyonu ile bitki büyümesi çeşitli şekillerde etkilenir ve bu da uzun süreli tozlaşma dönemlerine yol açar. Çevre kirliliği etkisi sadece cilt ve mukoza zarını tahriş etmekle kalmaz polen gibi alerjen taşıyıcılar atmosferde değişebilir ve alerjenleri serbest bırakarak ortam havasında alerjen içeren aerosollere neden olabilir (D’amato vd., 2015).

Alerjen olarak bakteri, virüs, fungus, polen, yumurta, çilek, çikolata, penisilin vs. gibi bir çok faktör vücuda ağız, solunum, enjeksiyon yoluyla girmektedir. Atopik alerji anafilaksi oluşum mekanizmasına benzer şekilde birkaç organı birden etkilemektedir. IgE sınıfı antikorların CH₃ ve CH₄ lokuslarının ikisiyle hedef hücreye bağlanmaktadır. Atopik alerjiler, Preustniz-Kustuner (PK) gibi deri testi ile tanımlanabilmektedir. Ancak çok duyarlı kişilerde anafilaksiye yol açabileceğinden çok dikkat edilmesi gerekmektedir (Özbal, 2000)

Polenlerde alerjenlerin varlığı ve ekspresyon seviyeleri bitki türüne, değişen iklime, olgunlaşma aşamasına ve çevresel faktörlere (kirlilik) bağlı olarak değişebilir. İklim koşullarındaki değişiklikler nedeniyle, günlük ve mevsimsel yayılım üzerine gözlemler çok önemli hale gelir çünkü bu yolla elde edilen bilgiler alerjik hastalıkları olan bireylerin tedavisinde doğrudan uygulamalara sahiptir (Sharma, 2010).

Polen alerjisinin tüm Avrupa'da dikkate değer bir klinik etkisi vardır ve Avrupa'da polenlerin neden olduğu solunum yolu alerjik reaksiyonlarının prevalansının son on yılda arttığını gösteren bir dizi kanıt vardır. Polen alerjisi prevalansının şu anda %40 kadar olduğu tahmin edilmektedir. Alerjenlere maruz kalma, hava kirliliğini de içeren astımın çevresel belirleyicileri arasında önemli bir faktördür (D'amato, 2007).

Polen doğal, biyolojik olarak aktif ve birçok bitkinin erkek üreme hücrelerinden oluşan bir maddedir. Alerjik hastalıkları teşhis ve tedavi etmek için kullanılan alerjen ekstraktlarının üretiminde kaynak malzeme olarak kullanıldığından, aktif bir farmasötik bileşen olarak kabul edilir. Bu nedenle, polen alerjen ekstraktları üretmek için üretim süreçleri ve bu ürünlerin kalitesi, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Biyolojik Değerlendirme ve Araştırma Merkezi (CBER) tarafından düzenlenmektedir. Avrupa'daki ana düzenleyici kurumlar arasında ise Avrupa Farmakopisi ile uyumlu Avrupa İlaç Ajansı'ı (EMA) yer almaktadır (Codina ve Lockey, 2016).

Polenlerin alerjen özellikleri intin ve eksin tabakalarında bulunan lipoprotein, polisakkarit ve proteinlerden kaynaklandığı bilinmektedir (Pehlivan, 1984; 1995; Esch vd., 2001). Literatürde yer alan polen alerjisi ile ilgili son çalışmalar, major alerjenlerin çoğunun polenin içerisinde amiloplastlarda, sitoplazmada bazen hücre organellerine bağlı olarak, nadiren de sitoplazmada yalnız başına ya da polen duvarına bağlı olarak bulunduğunu gösterir niteliktedir (Grote, 2001).

Türkiye'de atmosferdeki polen varlığının araştırılması 1967 yılında, Ankara'da alerjenik polen ve sporlarının araştırılması ile başlamıştır. İnceoğlu ve arkadaşlarının 1994 yılında Ankara'nın atmosferik polen konsantrasyonu ile ilgili yaptıkları çalışma ile Aeropolinojik çalışmalara katkıda bulunmuşlardır. Aytuğ vd. 1974'de İstanbul ve çevresi, 1990' ise Trakya bölgesi ile ilgili yaptıkları palinolojik çalışmalarla Türkiye'nin polen haritasının oluşmasına katkıda bulunmuşlardır (Özkaragöz ve Karamanoğlu, 1967; Aytuğ vd., 1974; Aytuğ vd., 1990; İnceoğlu vd., 1994)

Literatürde *T. cordata*'nın alerjen proteinleri ile ilgili ilk çalışma ise 2001 yılında Mur ve ark tarafından yapılmış olup daha öncesinde bununla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptıkları çalışmada daha önce alerjik şikayetlerle gelen hastanın *T. cordata*'ya karşı IgE'sinin yüksek olduğu tespit edilmiş ve *in vitro* çalışmalarla da *T. cordata* eskresinden yapılan analizlerde 3 farklı alerjen proteini olduğunu saptamışlardır. Saptadıkları bu alerjen proteinler sırasıyla 10, 21 ve 50 kDa ağırlığındadır.

Polen alerjisinde tanı hastaların klinik geçmişiyle başlamaktadır. Alerjik semptomlar tanımladığında, IgE antikor duyarlılığı *in vivo* cilt testleri (prick veya intradermal) veya *in vitro* kan testleri (alerjene özgü IgE antikor serolojik testleri) ile doğrulanır. Alerjenleri belirlemek için deri ve kan testleri yapılır. Bu testler tek başına alerjinin tespitinde yeterli olmayabilir. Kullanılan bu testler arasında deri testleri, kan testlerine göre daha hassas ve güvenilirdir. Bu testler farklı yöntemler kullanılarak uygulanabilir. Bu yöntemler arasında nazal provakasyon testler, intradermal testler, skin prick test ve RAST yer almaktadır (Jae-Won, 2018).

Alerjik reaksiyonların tedavisinde son zamanlarda immünoterapi ve rekombinant DNA teknolojisi yöntemleri giderek popülerleşmektedir. İmmünoterapi yöntemi, deri altına enjeksiyon veya alerjen ekstresi dil altı uygulamasıyla (sublingual) gerçekleştirilen, tip I alerjik hastalıklara karşı etkili bir tedavidir. Alerjenleri kodlayan plazmid DNA ve mRNA aşılarının, alerjik Th 2 -tarafı reaksiyonları modüle eden veya bunlara karşı koyan Th 1 yanı sıra T düzenleyici yanıtları indüklediği gösterilmiştir (Scheibelhofer vd.; 2018).

BÖLÜM III

MATERYAL METOT

3.1 Materyal

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- BCA (bişinkoninik asit) (Serva, Almanya)
- BSA (bovin serum albumin) (Sigma, ABD)
- Aseton (Merck, Almanya)
- Amonyum bi karbonat (NH_4HCO_3) (Tekkim, Türkiye)
- Gliserin (%99.5 Tekkim, Türkiye)
- Etanol Absolute (Merck, Almanya)
- İzopropil alkol (Tekkim, Türkiye)
- Trizma-base (Sigma, ABD)
- Gümüş nitrat (AgNO_3) (Isolab, Almanya)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck, Almanya)
- Akrilamid (Merck, Almanya)
- Bis-akrilamid (Amresco, Belgium)
- Amonyum per sülfat (APS) (Merck, Almanya)
- TEMED (Amersham Bioscience, İngiltere)
- Merkaptotenol (Merck, Almanya)
- Bromofenol blue (AppliChem, Almanya)
- Metanol (Merck, Almanya)
- Formaldehit (Sigma, ABD)
- Sodyum tiyosülfat (Sigma, ABD)

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Desikatör (ISO Lab, Almanya)
- İnvert Mikroskop (Nicon Eclips, ABD)
- Pasteur Pipet Tabancası (Capp Aid, Danimarka)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)
- Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Buzdolabı (+ 4 °C, Vestel, Türkiye)
- Hassas Terazî (Denver instrument, Precissa, İsviçre)
- Otoklav (HMC Hiroyama, Japonya)
- Etüv (Selekta, İspanya)
- Otomatik Pipet (Eppendorf, Research Plus, Almanya)
- Elek (Test eleği, Aslan, Türkiye)
- SDS-PAGE Güç Kaynağı (Cleaver, İngiltere)
- SDS –PAGE Tank (Hoefer, ABD)
- Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad, ABD)

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

-Tris HCl tampon çözeltisi (1,875 M, pH 8.8)

-Trizma-base 45.43 g

-Son hacim 200 mL dH₂O tamamlanmıştır.

-3 N HCl ile pH 8.8' e ayarlanmıştır.

-Tris HCl (0,6 M, pH 6.8)

-Trizma- base 14.54 g

-Son hacim dH₂O ile 200 mL tamamlanmıştır.

-3 N HCl ile pH 6.8' e ayarlanmıştır.

-Akrilamid/ bisakrilamid çözeltisi

-Akrilamid 29.2 g

- Bis-akrilamid 0.8 g

-Son hacim dH₂O ile 200 mL ' ye tamamlanmıştır.

- %10 Amonyum per Sülfat (APS) çözeltisi

-APS 1 g

-Son hacim dH₂O ile 10 mL 'ye tamamlanmıştır.

- %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisi

-SDS 10 g

- Son hacim dH₂O ile 100 mL 'ye tamamlanmıştır.

-5X Tank tampon çözeltisi

-Trizma-base 15 g

- Glisin 72 g

- SDS 5 g

Son hacim dH₂O ile 1 L ' ye tamamlanmıştır.

-2X Örnek Uygulama Tamponu (0,125 M Tris, %20 Gliserol, %4 SDS, %10 2-Merkaptoetanol, % 0.2 Bromofenol blue)

-Tris (0,6 M, pH 6,8) 2.08 mL

-SDS (%10 SDS) 4 mL

- Gliserol 2 mL

- 2- Merkaptoetanol 1 mL

- Son hacim dH₂O ile 10 mL 'ye tamamlanmıştır.

-Formaldehit fiksatif çözeltisi

-Metanol 400 mL

- %37 Formaldehit 500 µL

-Son hacim dH₂O ile 1L' ye tamamlanmıştır.

-Gümüş nitrat çözeltisi (% 0.1'lik)

-Gümüş nitrat 1 g

-Son hacim dH₂O ile 1 L' ye tamamlanmıştır.

-Sodyum tiyosülfat çözeltisi

- Sodyum tiyosülfat 0.2 g

-Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır

-Tiyosülfatlı görüntü oluşturma çözeltisi

-Sodyum karbonat 30 g

- Sodyum tiyosülfat çözeltisi 20 mL

- Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

- 2.3 M Sitrik asit çözeltisi

- Sitrik asit 22.1 g

- Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

-Amonyum bikarbonat çözeltisinin hazırlanması:

-500mL için 9,882 g NH₄HCO₃ tartılmıştır.

- Son hacim dH₂O ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

Çözünene kadar manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir.

-Gliserin jelatinin

-toz jelatin	7 g
-gliserin	50 mL
-% 2'lik asetik fenil	1 mL
-bazik fuksin	2 mL
-42 mL distile su eklenmiştir.	

3.2 METOT

3.2.1. Polen Örnekleri

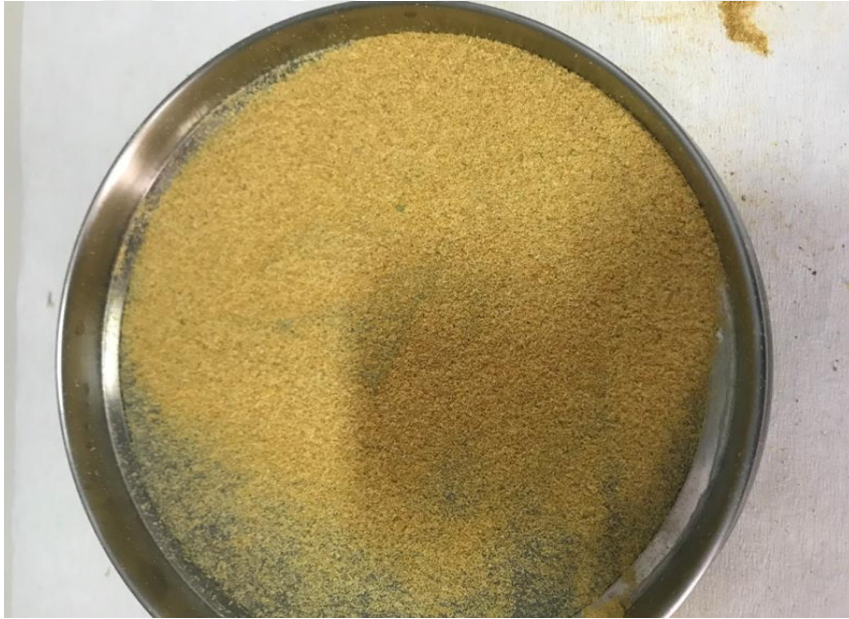
Bu tez kapsamında *Tilia cordata*'nın (küçük yapraklı ıhlamur) polen örnekleri çalışılmıştır.

3.2.2 Polen Örneklerinin Toplanması ve Eldesi

- *T. cordata* polenleri Gaziantep Üniversitesi yerleşkesinde 2019 Mayıs-Haziran aylarında steril eldivenler kullanarak toplanmıştır.
- Toplanan *T. cordata* çiçekleri steril zarflara konulmuştur. Daha sonra ise polenler kuru ve nemli olmayan laboratuvar ortamında birkaç gün süreyle steril kağıtlar üzerinde kurutulmuştur (Şekil 3.1).
- Kuruyan *T. cordata* 3 farklı por çapına sahip (180, 90, 63 µm) steril eleklerden geçirilerek diğer partiküllerden arındırılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1 Kurutulmuş *T. cordata* çiçekleri



Şekil 3.2 Elekten geçirildikten sonra elde edilen *T. cordata* polenleri

- Polenler tam anlamıyla kuruması için desikatörde 24 saat bekletilmiştir. Nem alıcı olarak desikatörde silika jel kullanılmıştır.
- Daha sonra ise polenleri yabancı patiküllerden arındırma amacı ile asetonla yıkama yöntemi uygulanmıştır. Bunun için, ilk önce polenler hassas terazide 500 mg tartılmıştır. Üzerine aseton ilave edilmiştir ve iyice çalkalanmıştır.
- 15 mL/g polen aseton karışımı mikro ependorflara konularak 11.000 rpm’de 1 saat santrifüj edilmiştir (Hettich Zentrifugen Mikro 200, Almanya).

Santrifüjden aldığımız örneklerin süpernatant kısmı ayrılarak falkona konulmuştur. Falkonun dış kısmı alüminyum folyo ile ışık almayacak şekilde sarılmış ve +4°C’de kullanıma hazır şekilde saklanmıştır.

3.2.3 Polen Morfoloji Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan *T. cordata* türüne ait polen örnekleri Woodhouse (1935) yöntemine göre hazırlanmış ve mikroskop görüntüleri hazırlanan preparatlardan alınmıştır.

Woodhouse Yöntemi

-Saflaştırdığımız *T. cordata* polenleri lam üzerine konularak, barındırdığı yağ ve reçinelerden arındırmak için %96 ‘lık alkolden pasteur pipetle 2-3 damla damlatılmıştır. Alkolün buharlaşması için birkaç dakika 37°C’de etüvde bekletilmiştir.

-Alkol buharlaştıktan sonra etüvden alınan preparatın üzerine daha önce hazırlanan bazik fuksin eklenmiş, gliserin jelatinden 2-3 mm³ eklenmiş ve 37°C ısıtıcıda erimesi sağlanmıştır.

-Daha sonra lamelle kapatılmış ve mikroskop altında incelenmeye hazır hale gelmiştir.

- *T. cordata* polenleri (Nikon ECLİPSE TS 100) X40’ lık objektifle görüntülenmiştir (Şekil 3.3)



Şekil 3.3 *T.cordata* polenlerine ait mikroskop görüntüleri

Gliserin jelatinin hazırlanması

-Gliserin jelatin hazırlarken ilk önce 7g toz jelatin tartılmış ve üzerine 42 mL distile su eklenmiştir.

-Jelatin ve su karışımı yaklaşık 2 saat jelatinin şişmesi için bekletilmiştir.

-Jelatinli karışım homojen bir hal alması için önceden 80°C' ye ayarlanan su banyosunda 20dk bekletilmiştir. Karışım ara ara baget yardımıyla karıştırılmıştır.

-20 dk sonunda 50 mL gliserin eklenmiş ve su banyosunda 20 dk daha bekletilmiştir.

-Mantar ve bakteri kontaminasyonunu engellemek için 1 mL %2'lik asetik fenil eklenmiştir (Cabi, 2005).

-Karışıma polenlerin görünürlüğünü arttırmak için 2ml bazik fuksin eklendi. Daha sonra steril petri kaplarına dökülen gliserin jelatin soğumaya bırakılmıştır.

-Soğuduktan sonra etiketleme yapılarak kullanılmak üzere hazır hale gelen jelatin +4'de saklanmıştır.

3.2.4 Polen Ekstrelerinin Hazırlanması

- +4°C'de saklanan saf polen örnekleri 1:12 (ağırlık:hacim) 125 mM Amonyum bi karbonat (NH_4HCO_3) çözeltisinde 4°C'de 12 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

-Daha sonra polen kalıntılarından arındırmak için 1 saat süreyle 4°C'de 13000 xg de santrifüj edilmiştir.

-Santrifüjden sonra üst sıvı filtrasyon sisteminde önce Wattman filtre kağıdı (125 mm) daha sonra ise 125 µm ve 0,8 µm por çaplı filtreden geçirilerek partiküllerden arındırılmıştır.

-Elde edilen filtrat 48 saat süreyle 4°C de saf suya karşı diyaliz tüpü içinde diyaliz işlemine tabi tutulmuştur.

-Diyaliz işleminin sonunda polen ekstraktları kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.2.5 Polen Ekstresindeki Toplam Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

-*T.cordata* polen ekstresindeki polen konsantrasyonunu saptamak için BCA (bişinkoninik asit) yöntemi Walker'ın (2002) önerdiği gibi kullanılmıştır.

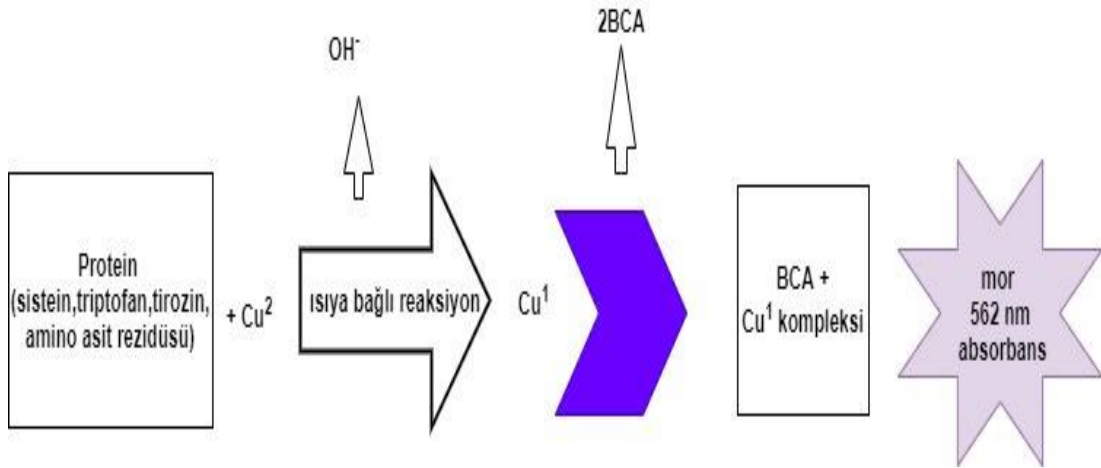
- Pierce Thermo Scientific BCA Protein Assay Kiti kullanılarak belirlenmiştir.

-Bu yöntemin temelinde Cu^{2+} iyonları peptid bağlarına bağlanır ve Cu^{1+} iyonuna indirgenirler. İndirgenmiş Cu^{1+} iyonları ise BCA ile renkli bir kompleks oluşturur ve bu rengin şiddeti proteinin yoğunluğu ile orantılıdır (Şekil 3.4).

-Protein örnekleri 5:1 (ağırlık:hacim) oranında saf su içerisinde çözündürüldükten sonra 96 kuyucuklu pleytlere 3 tekrarlı, her bir kuyucuğa 25 μL olacak şekilde eklenmiştir.

-Üzerine 200 μL hazırlamış olduğumuz BCA 50:1 oranında A reaktifi ile B reaktifinin karıştırılmasıyla hazırlanan) belirtecini ekleyerek 30 dk boyunca 37°C etüvde bekletilmiştir.

-Son olarak 562 nm'de kör'e (saf su) karşı absorbans değeri ölçülmüştür.



Şekil 3.4 BCA yöntemi basamakları

3.2.6 SDS PAGE ELEKTROFOREZ

-*T.cordata*'nın alerjen polen proteinlerini görüntülemek için Walker (2002) tarafından önerilen SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemi kullanılmıştır.

-Bu yöntemin temeli elektriksel alanda yüklü moleküllerin ayrıştırılmasına dayanır.

-Bir proteinin büyüklüğü ve alt birimlerinin niteliği SDS-PAGE ile belirlenebilir.

-Protein molekülünü içeren bir çözeltiye elektrik alan uygulandığında protein net yüküne, büyüklüğüne ve birimine bağlı olarak belirli hızda hareket eder.

-SDS-PAGE jel elektroforezinde polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir.

-SDS polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden anyonik bir deterjandır.

-Ayrıca molekülere negatif bir yükte kazandırmaktadır. SDS-PAGE'in en önemli yönü polipeptidlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesine olanak tanımasıdır.

-Molekül ağırlığı bilinmeyen protein örnek, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte aynı jel üzerinde yan yana kuyucuklara yüklenerek ayrı hatlarda elektroforetik olarak ayrılır.

-Proteinlerin içinde hareket ettiği ortam olarak çok sayıda çapraz bağı bulunan poliakrilamid jel kullanılır.

-İlk olarak tablo 2'de belirtilen çözelti ve tamponlar hazırlanmıştır. Çözelti ve tamponlar hazırlandıktan sonra jel kasetine yerleştireceğimiz cam malzemeler deterjanla yıkandı, distile sudan geçirilmiştir.

-Daha sonra %70'lik alkolle silindi ve iyice kurulandı. %10'luk separating jel tablo 3.3'deki gibi hazırlanmıştır.

-Hazırlanan separating jelden çözünmüş O₂'yi uzaklaştırmak için 5dk. ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir.

-Su banyosundan sonra jele TEMED eklenmiş ve gel iki cam arasına camın 3/4'ünü dolduracak şekilde ince uçlu pipet yardımı ile boşaltılmıştır.

-Jelin üzerine %96'lık izopropanol eklenerek hem jelin oksijenle teması kesilmiş oldu hem de polimerleşme sırasında jelin üst kısmının düzgün bir hat şeklinde oluşması sağlanmıştır.

-Ayırma jel polimerleştikten sonra %5'lik yükleme jel hazırlanmıştır (Tablo 3.4). Stacking jele en son APS ve TEMED eklenmiştir.

-Ayırma jelin üzerindeki izopropil alkol döküldü ve yükleme jel eklenmiştir. Örnekleri yükleneceği kuyucukların oluşması için distile sudan geçirilmiş tarak dikkatlice yerleştirilmiştir.

-Jeller polimerleştikten jel kaseti sonra 1X tank tamponu ile doldurulan elektrophoretik tankına yerleştirilmiştir.

-Tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Kuyucuklar distile su ile yıkandı. PBS 'de çözdüğümüz *T.cordata* polenlerine ait protein ekstratlarını 1:1 (v:v) oranında örnek uygulama tamponu (Tablo 3.2) ile karıştırarak kuyucuk başına 20 µg protein olacak şekilde jele yüklenmiştir.

-Kuyucuklardan en az birine 5µL protein marker (Abm, opti protein marker) yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlanınca elektrophoretik sabit voltta (235 V) yaklaşık 90 dk yürütülmüştür.

-Yürütme işleminin sonunda örneklere ait bantları analiz etmek için gümüş nitrat (AgNO₃) boyama yapılmıştır.

Tablo 3.2 SDS-PAGE çözeltileri

Tris-HCl tamponu(1,875 M, pH 8.8) (ayırma jeli)	Trizma-base 3N HCl ile pH 8.8' e ayarlanmıştır. Son hacim dH ₂ O ile 200 mL'ye tamamlanmıştır.	45.43 g
Tris HCl tamponu (0,6 M, pH 6.8) (yükleme jeli)	Trizma base 3N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. Son hacim dH ₂ O ile 200mL'ye tamamlanmıştır.	14.54 g
Stok akrilamid çözeltisi	Akrilamid Bis-akrilamid Son hacim dH ₂ O ile 100mL'ye tamamlanmıştır.	30 g 0.8 g
%10 APS (amonyum per sülfat)	APS Son hacim dH ₂ O ile 10mL'ye tamamlanmıştır.	1 g
%10 SDS (sodyum dodesil sülfat)	SDS Son hacim dH ₂ O ile 100mL'ye tamamlanmıştır.	10 g
5X Tank Tamponu	trizma-base glisin SDS Son hacim dH ₂ O ile 1L'ye tamamlanmıştır.	15 g 72 g 5 g
2X Örnek Uygulama Tamponu (0.125M Tris, %20 Gliserol, %4 SDS %10 2-Merkaptoetanol, %0.2 Bromofenol mavisi)	tris (0.6M, pH 6.8) SDS (%10 SDS) gliserol 2-merkaptoetanol Son hacim dH ₂ O ile 10 mL' ye tamamlanmıştır.	2.08 mL 4 mL 2 mL 1 mL

Tablo 3.3 Separating gel (ayırma jeli) için gerekli çözeltiler (%12)

Akrilamid/bisakrilamid	2mL
Tris HCl tamponu pH 8.8	1.25mL
SDS %10	50µL
Distile su	1.7mL
TEMED	2.5 µL
APS %10	50 µL

Tablo 3.4 Stacking gel (yükleme jeli) için gerekli çözeltiler

Akrilamid/bisakrilamid	0,325 mL
Tris HCl tamponu pH 6.8	0, 575 mL
SDS (%10)	25 µL
Distile su	1,525 mL
TEMED	2,5 µL
APS %10	12,5 µL

3.2.7 Gümüş Boyama

-Gümüş boyama, karboksil ve sülfhidril grupları dahil olmak üzere amino asitlerin kimyasal yan zincirlerine gümüş bağlandığı için jellerde protein tanımlaması için kullanılan güçlü bir tekniktir.

-1972'de uygulanmaya başlanmış ve daha sonra poliakrilamid jel elektroforezinde protein ayrımı için uyarlanmıştır.

-Proteinlerdeki çekirdeklenme bölgeleri, formaldehit tarafından gümüş iyonlarının mikroskopik elementel gümüş tanelerine indirgenmesini teşvik ederek bunların saptanmasını sağlar.

-Yüksek duyarlılığı sayesinde ve diğer boyama yöntemlerine göre daha yaygın olarak kullanılır.

-*T. cordata*'ya ait alerjen polen proteinlerini tespit etmek için SDS-PAGE elektroforezi ile yapılan yürütme işleminden sonra jelde oluşan bantları görünür kılmak için Heuskeshoven ve Dernik (1985) tarafından önerilen yöntem ile gümüş boyama işlemi yapılmıştır.

-SDS-PAGE işleminin sonunda jel dikkatli bir şekilde plastik kaba aktarıldı. Distile su ile 1 dk jeli yıkadıktan sonra formaldehitli fiksatif çözeltide 20 dakika çalkalayıcıda oda sıcaklığında düşük hızda çalkalanmıştır (Tablo 3.5).

-Fiksatif çözelti dökülerek 2 defa 10'ar dakika boyunca distile suda yine aynı hızda çalkalanarak yıkanmıştır.

-Yıkama işlemi sona erince sodyum tiyosülfatlı çözeltide 2dk çalkalanmıştır. Sodyum tiyosülfatlı çözelti dökülerek 2 kez 1'er dakika distile su ile yıkanmıştır.

-Son yıkama suyu uzaklaştırıldıktan sonra gümüş nitrat çözeltisinde (%0.1'lik) 20 dk boyunca düşük hızda çalkalanmıştır (50 devir/dk).Bu işlemden sonra jel tekrar distile su ile yıkanmıştır.

-Son aşamada jel tiyosülfatlı görüntü oluşturma çözeltisinde kahverengi bantlar oluşana kadar çalkalandı. Bantlar oluşunca 2.3 M sitrik asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Görüntüleme cihazı (Bio Rad, Gel Doc Ez Imager) ile görüntü kaydedilmiştir.

Tablo 3.5 Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

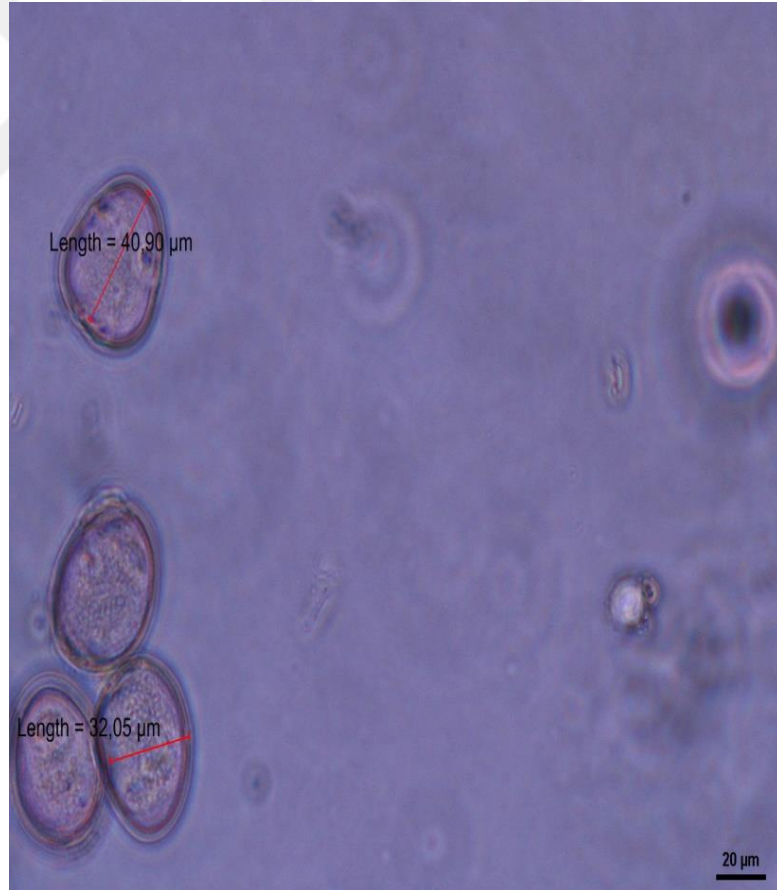
ÇÖZELTİLER	BİLEŞENLER
Formaldehit fiksatif çözeltisi	
Metanol	400 mL
%37 Formaldehit	500 µL
Son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlanmıştır.	
Sodyum tiyosülfat çözeltisi	
Sodyum tiyosülfat	0.2 g ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.	
% 01.lik Gümüş nitrat çözeltisi	
Gümüş nitrat	1 g (AgNO_3)
Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.	
Tiyosülfatlı görüntü oluşturma Çözeltisi	
Sodyum karbonat	30 g
Sodyum tiyosülfat çözeltisi	20 mL
Son hacim distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır.	
2.3 M Sitrik asit çözeltisi	
Sitrik asit	22.1 g
Son hacim distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır.	

BÖLÜM IV.

4.BULGULAR

4.1 Polen Morfolojisi

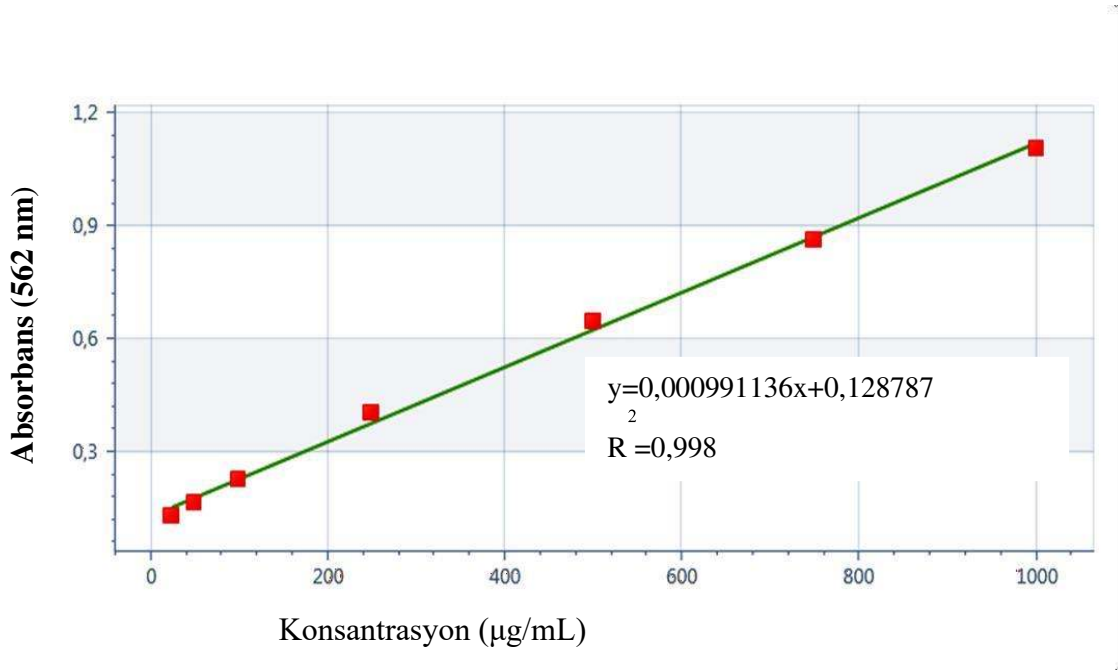
Saflaştırılan polen örneklerinin preparat görüntülerinden polen örneklerinin por çapı, ekzin ve polen çapları ölçülmüştür (Şekil. 4.1). Ölçümler PalDat (<https://www.paldat.org/>) veri tabanındaki *T. cordata*'ya ait ölçümlerle (ortalama 26-50 μm) paralellik göstermekte olup, yaptığımız ölçümleri desteklemektedir.



Şekil 4.1 *T. cordata*'nın polenlerine ait mikrofotograflar

4.2. Polen Ekstrelerinin Protein Konsantrasyonu Saptanması

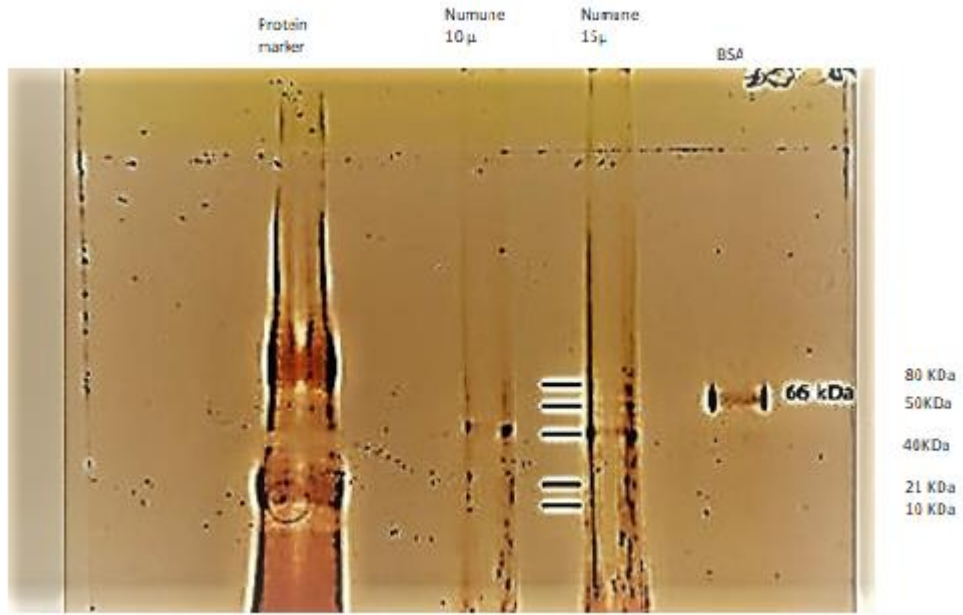
T. cordata polen ekstresindeki protein konsantrasyonu BCA Protein Macro Assay Kit (Serva Electrophoresis GmbH) kullanılarak belirlenmiştir. Spektrofotometrede 562 nm’ de yaptığımız ölçümlerde protein konsantrasyonu 5.193,32 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Polen ekstresine ait protein konsantrasyonu sığır serum albümin (BSA) standartları (0.0313, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1 mg/mL) ile çizilen standart grafik yardımı ile saptanmıştır. *T. cordata* polen ekstresi protein konsantrasyonu bu grafik için elde edilen denklem yardımıyla hesaplanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 BSA standart grafiği. BSA standartlarının [0.0313, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1mg/mL 562 nm absorbans değerleri kullanılarak çizilmiştir.]

4.3 SDS-PAGE ile alerjenik proteinlerin görüntülenmesi

T. cordata total proteinlerinin yürütülmesi ve elde edilen jel görüntüsünde *T. cordata*'nın 10,21,50, 40 ve 80 kDa ağırlığında 5 farklı alerjen protein bandı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). 2001 yılında Mur ve arkadaşlarına ait çalışmada 10, 21, 50 kDa ağırlığındaki alerjenlerden bahsedilmektedir. 40 ve 80 kDa ağırlığındaki alerjen proteinlere ait bantlar ise ilk kez bizim yapmış olduğumuz çalışma sonucu elde edilmiştir.



Şekil.4.3 *T. cordata* alerjen proteinlerine ait SDS-PAGE görüntüleri.

BÖLÜM V

5.TARTIŞMA

Alerjen faktörler arasında polenler, akarlar, mantar sporları, evcil hayvan tüyleri bazı besinler, içecekler ve ilaçlar yer alır ve alerjik rinit, rinokonjoktivit, alerjik astım gibi bir çok alerjik kökenli semptoma neden olabilirler. Akut alerjik reaksiyonlar, bir alerjen, yüksek afiniteli IgE reseptörünün (FceRI-a) bir zinciri tarafından mast hücrelerine veya bazofillere bağlanan IgE ile etkileşime girdiğinde, önceden oluşturulmuş granül ile ilişkili aracılardan, zardan türetilen lipidlerin, sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasından kaynaklanır (Kinet, 1999). Bu reseptör ayrıca antijen sunan hücrelerde de meydana gelir ve burada alerjenin T hücrelerine IgE'ye bağlı olarak yakalanmasını ve sunumunu kolaylaştırabilir (Sting, 1997). Eozinofiller de FceRI-a'ya sahiptir, ancak bu hücreler de neredeyse tamamen hücre içidir; eozinofilin degranülasyonu ile salındıktan sonra, lokal IgE seviyelerinin düzenlenmesine yardımcı olabilir (Corry ve Kheradmand, 1999).

Alerjik reaksiyonlara neden alerjen faktörlerin arasında polenler önemli bir yere sahiptir. Polenler gerek havaya yayılma gerekse çok uzun mesafelere kolaylıkla taşınması (rüzgar, tozlaşmayı sağlayan böcekler vs.) nedeniyle yıl boyunca aktif bir şekilde atmosferde bulunur ve alerjik reaksiyonlara neden olurlar. Alerjen proteinler arasında polen alerjenleri şimdiye kadar incelenen en iyi karakterize edilmiş alerjenik proteinler arasındadır. Şimdiye kadar derlenen çok sayıda veriye rağmen, polen alerjenlerinin protein ailesine ve taksonomik kökene göre sistematik bir sınıflandırması henüz tam anlamıyla yapılmamıştır. Yapılan çalışmalarda 157 polen alerjeninin Pfam protein ailesi veri tabanı ile karşılaştırılması, polen alerjenlerinin sadece 29 protein ailesi arasında dağıldığını ortaya çıkarmıştır. Bir proteine karşı alerjik reaksiyonun ortaya çıkması, bağışıklık sistemi ile protein arasındaki karmaşık etkileşime bağlıdır. Proteinler arasında, alerjenitenin tek, ortak, yapısal bir nedeni olmayabileceğini gösteren, sürekli bir duyarlılaştırıcı aktivite olduğu görülmektedir. Güçlü alerjenler, bir veya iki güçlü alerjenik özelliğe sahip olmak yerine, tek başına

çok az etkiye sahip olan ancak birlikte güçlü bir genel etki üretebilen birçok proalerjenik özelliğe sahip olabilir. Bu konudaki zorluk ise her yapısal özelliğin protein alerjenitesine katkıda bulunup bulunmadığını grafiklendirmek ve ölçmektir (Russell, 2000).

Geçmişten günümüze kadar yapılan bilimsel çalışmalarda çeşitli kaynaklardan önemli alerjen proteinler izole edilmiş, yapı ve fonksiyonlarına göre farklı protein gruplarında sınıflandırılmıştır. Bunlar arasında en çok bilinen alerjenler; depo proteinleri, serum albuminler, tropomiyosinler, lipokalinler, patogeneze ilişkili protein ailesi 10 (PR-10, pathogenesis-related protein family 10'') ailesi proteinleri, parvalbuminler, profilinler kalsiyum bağlayan proteinler ve non spesifik lipid transfer proteinleridir (Sastre, 2010).

Her bir alerjen faktör farklı alerjik bileşenler içerebilir ve yapısında protein barındıran her şey alerjen özellik gösterebilir. Alerjen bileşenleri genel olarak birkaç farklı epitop (ilgili antikorun bağlanmasından sorumlu üç boyutlu bağlanma bölgesi) barındırır. Polenlerin başlıca alerjen faktörü olmasının bir başka nedeni ise birçok bitkinin ayrı ayrı alerjen polenlere sahip olması ve her birinin disseminasyon döneminin farklı zamana denk gelmesidir. Bunların yanı sıra artan çevre kirliliği, iklim değişiklikleri, atmosfere yayılan zehirli gazlar da polen yapısını değiştirmekte ve polenin alerjenitesini etkilemektedir (D'Amato, 2015; 2016). Bu da polen üretiminde artışa ve alerjenik özelliklerini artıran faktörlerde değişikliğe neden olmaktadır. Sonuç olarak, orta ve uzun vadede polenlere bağlı alerjik hastalıkların görülme sıklığının artması beklenmektedir.

Polen partiküllerinin solunması nedeniyle alerjik solunum semptomlarının artan yaygınlığı ve buna bağlı artan maliyetler polen alerjisini bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. Alerjik hastalarda semptomların şiddeti alerjenik polen miktarına bağlıdır, ancak alerjenlerin yanı sıra diğer faktörlerin de rol oynadığı görülmektedir. Polen taneleri üst solunum yoluna nüfuz etmesine rağmen, boyutları her zaman 10 µm'den büyük olduğu için bronşlara nadiren ulaşırlar. Bununla birlikte, bronşiyal astım ve iritatif öksürük gibi eşdeğerleri polene alerjisi olan hastalarda nadir değildir (D'Amato, 2020). Avrupalı genç yetişkinlerde %10 ila 35'i polen alerjenlerine karşı IgE antikorları görülmektedir (D'Amato vd., 2007). ABD' de ise alerjik hastalıkların prevalansı %30 civarındadır (Pincus vd., 2011). Dünya Sağlık

Örgütü, dünya çapında 400 milyondan fazla insanın alerjik rinitten ve 300 milyon kişinin de astımdan muzdarip olduğunu tahmin ediyor (Gamble vd., 2008). Alerjik hastalıklarla ilgili veriler değerlendirildiğinde hastalık günümüzde toplum sağlığını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu sorunlar beraberinde alerjenlerin tespiti, alerjen hastalıklara karşı tedavi yöntemleri hakkında yapılan araştırmaların önemini arttırmaktadır.

Tiliaceae familyasının bir üyesi olan *T. cordata* İngiltere ve Galler'de, İskoçya'nın güneyinde, Güney İspanya, İtalya ve Yunanistan dışında Batı Avrupa'nın çoğu ve ABD'nin bazı bölgelerinde doğal olarak yetişir (Lewis, 1983). Ülkemizde de Tiliaceae familyasına ait olan türler ve *T. cordata* yetiştirilmektedir.

T. cordata polenlerinin ekvator çapı 25-37 µm'dir ve polenler trikolporattır, por lümen konileri polenlerin yüzeyine doğru olup oluklar ise kısa elipstir ve düzensiz sınırlara sahiptir. Duvar yapısı tektat olmakla birlikte yüzey yapısı düzensiz mikoretikülattır (Weber, 2014). Bizim yaptığımız ölçümlerde örneklerimize ait polenlerin ekvator çapları 32-40 µm olarak saptanmıştır. Bu da literatürle paralellik göstermekte ve sonuçlarımızı desteklemektedir.

İhlamur alerjisi (dolayısıyla en yaygın türü olan *T. cordata* ile) ile ilgili daha önce yapılmış pek fazla yayına rastlamasak da bununla ilgili yapılan çalışmalarda *T. cordata*'ya karşı alerjik rinit, rinokonjonktivit, öksürük ve alerjik kontakt dermatit tanımlanmıştır (Weber, 2014). Mur. ve arkadaşlarının (2001) yapmış olduğu bir çalışmada *T. cordata*'ya ait 3 farklı alerjen proteinin varlığından bahsedilmektedir. Daha önce zeytin ve çimene karşı alerjik öyküsü olan hasta 6 yıllık bir immunoterapi ile iyileşmiştir. Fakat her Haziran ayında göz, damak ve burunda kaşıntı, hapşıırma ve gece öksürükleri gibi alerjik olduğuna inandığı belirtiler göstermiştir. Yapılan prick testte genel aeroalerjenlere ve 25 alerjik besine karşı negatif sonuç alınmıştır. Bununla birlikte Haziran ayında evinden uzak olduğu zamanlarda ise asemptomatik olması sonucunda alerjinin nedeninin evinin yakınında bulunan ıhlamur çiçekleri olduğunu düşündürmüştür. Hastanın semptomlarının ıhlamur polenleri ile ilgili olduğu düşünüldüğüne bununla ilgili testler yapılmalıdır çünkü bazen o bölgede baskın şekilde bulunan polenler (çimen, zeytin gibi) ıhlamur alerjisini gizleyebilir (Mur. vd., 2001). Klinik çalışmalarda hastanın serumunda *T. cordata* ekstresine karşı 10, 21, 50kDa ağırlığında IgE

bantları gözlemlenmiştir. Yaptıkları laboratuvar araştırmasında ise deri prick testi (SPT) (%5 w/v) pozitif çıkmıştır (Mur. vd., 2001). Bu 50kDa ağırlığındaki spesifik alerjen protein Allergome veri tabanında **Til c** olarak adlandırılmıştır. Fakat bu spesifik alerjen protein için literatürde kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Alerjenlere ait proteinlerin tespiti ve literatüre kazandırılması hem klinik çalışmalarda hem de alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır. Alerjen proteinlerin tespiti tanı ve tedavinin ilk ve en önemli basamağını oluşturmakla birlikte doğru teşhis açısından da oldukça önemlidir.

Literatürde *T. cordata* ile ilgili dikkat çeken diğer bir nokta ise Portekiz’de çocuklarda % 11,4, Tükiye’de ise çocuklardaki alerjik duyarlanma oranı % 5,5 yetişkinlerde ise bu oran Türklerde % 42,5 gibi oldukça yüksek oranda olmasına rağmen *Tilia* alerjisiyle ilgili yayın sayısının oldukça az olmasıdır (Weber, 2014). *Tilia* ile ilgili daha fazla çalışma yapılması daha sağlıklı veriler elde etme açısından önem arz etmektedir. Çalışmaların verileri destekleyebilmesi için öncelikle *Tilia*’nın alerjen proteinleri tespit edilmeli ve isimlendirilmelidir. Alerjen proteinlerin tespiti yapılan alerjik testlerde (SPT gibi) *Tilia* ekstresinin kullanılmasına olanak sağlayarak daha sağlıklı sonuçlar elde etmeye yardımcı olacaktır.

Alerjen tanı ve tedavisinde ülkemizde ithal ekstraların daha fazla kullanıldığını baz aldığımızda; gerek çevresel faktörler gerekse ülkemizdeki alerjenlerin diğer ülkelere göre bazı farklılıklar gösterebileceğini göz önüne alırsak, polen ekstralarını kendi bulunduğumuz bölgedeki alerjenlerden üretmek hem daha tanı ve tedavi açısından daha başarılı sonuçlar doğuracak hem de maliyeti düşürecektir.

Bizim çalışmamızda *T.cordata*’ya ait alerjen proteinlerin tespiti için ilk önce polenler görüntülenmiştir. Daha sonra polen ekstresi elde edilmiştir. Elde edilen ekstrenin total protein konsantrasyonu belirlenmiştir. *T. cordata*’nın total protein konsantrasyonu 5.193,32 µg/mL olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE ile *T.cordata*’ya ait 10, 21, 50kDa ağırlığında alerjen protein bantların yanı sıra 40 ve 80kDa ağırlığı civarında iki farklı bant gözlemlenmiştir.

T. cordata’nın alerjen proteinleri ile ilgili çalışmalar çok az olması ileri düzeyde çalışmaların ve hastalara ait klinik verilerin olmaması geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu açıkça göstermektedir. Bizim çalışmamızın ilerleyen

zamanlarda *T.cordata*'nın alerjen proteinleri ile ilgili yapılacak daha kapsamlı çalışmalara katkı sağlayacağını umutetmekteyiz.



KAYNAKLAR

Abelson, M.B., Chambers ,W.A., Smith, L.M. (1990). Conjunctival allergen challenge. Aclinical approach to studying allergic conjunctivitis. *Arch Ophthalmol.* **108**.84–88.

Greiner, A.N., Hellings, P.W., Rotiroti, G., Scadding, G.K. (2011). Allergic rhinitis; **378** December 17/24/31, 2112-2122.

Allam, J.P., Bieber, T., Novak, N. (2009), Dendritic cells as potential targets for mucosal immunotherapy. *Journal current opinion in immunology*,:554–7.

Asher, M.I., Stewart, A.W., Mallol, J., Montefort, S., Lai, C.K., Ait-Khaled, N., Odhiambo, J. (2010). Which population level environmental factors are associated with asthma, rhinoconjunctivitis and eczema? Review of the ecological analyses of ISAAC Phase One. *Respir Res.* **11**.8–12.

Assarehzadegan, M.A., Sankian, M., Jabbari, F., Tehrani, M., Falak, R., Varasteh, A. (2011). Identification of methionine synthase (Sal k 3), as a novel allergen of Salsola kali pollen, *Molecular Biology Reports*, **38** (1), 65-73.

Bacon A.S., Ahluwalia P., Irani A.M., Schwartz L.B., Holgate S.T., Church M.K., McGill J.I. (2000). Tear and conjunctival changes during the allergen-induced early- and late-phase responses. *Journal Allergy Clinical Immunology.* **106**.948–954

BCA protein macroassay kit. Instruction manual. Kit for protein quantification. Serva electrophoresis GmbH. Heidelberg-Germany. 27.09.2021

Basehore, M.J., Howard, T.D., Lange, L.A., Moore, W.C., Hawkins, G.A., Marshik P.L., Harkins, M.S., Meyers, D.A., Bleecker E.R. (2004). A comprehensive evaluation of IL-4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *Journal Allergy Clinical Immunology.* **114**.80–7

Başer, K.H.C., Özek, T., Akgül, A., Tumen, G., (1993). Composition Of The Essential Oil Of *Nepeta Racemosa* Lam., *Journal of Essential Oil Research*, **5**(2), 215- 217.

Batanero, E., Villalba, M., Rodriguez, R. (1994). Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbo- hydrate moiety. *Molucular. Immunolgy*. **31**.31–37

Behrendt, H., Becker, W.M., (2001). Localization, relase and bioavailability of pollen allergens: the influence of enviromental factors, *Journal current opinion in immunology*, **13**. 709-715.

Belvisi, M.G., Fox, A.J. (1997) Neuropeptides. In: Kay AB, ed. Allergy and allergic diseases. **1**. Oxford, England: *Blackwell Scientific*, 447-80.

Bonin, I. S., Magrini, L., Rotiroti, G. L., Lambiase, A., Tomassini, A., Rumi C. (1997). The eosinophil and the eye. *Allergy* **52** (Suppl 34):44–47.

Bonini, S., Lambiase A., Bonini, S., Levi-Schaffer , F., Aloe L. (1999). Nerve growth factor: an important molecule in allergic inflammation and tissue remodeling. *. International Archives of Allergy and Immunology* **118**.159-62.

Braun, A., Lommatzsch, M., Renz, H. (2000). The role of neurotrophins in allergic bronchial asthma. *Clinical & Experimental Allergy* **30**.178-86.

Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., Breitenbach, M. (1989). The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO Journal* ;**8**.1935-8

Brooks, J., Shaw, G. (1968). Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids in nature. *Nature, Land*. **219**.532-533.

Cabi E. (2005). *Trakya bölgesindeki Gramineae familyasına ait bazı türlerin polen morfolojisinin incelenmesi ve polen ekstrallerinin hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü. Edirne.

Pigott, C.D. (1991). *Tilia Cordata* Miller. *Journal of Ecology* , **79**, No. 4 (Dec., 1991), (british ecological society) pp. 1147-1207

Choi, S.H., Bielory, L. (2008). Late-phase reaction in ocular allergy. *Current Opin Allergy Clinical Immunol* **8**:438–444

Ciampolini, F., Shivanna, K.R, Cresti, M. (1990). High humidity and heat stress causes dissociation of endoplasmic reticulum in tobacco plants. *Plant Biology* **104**:110–116

Corry, D.B., Kheradmand, F. (1999). Induction and regulation of the IgE response. *Nature* **402**:Suppl:B18-B23.

Clark, P., Jones, G.D. (2001). Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(21):11919–24.

Dahl, R., Kapp, A., Colombo, G., de Monchy, J.G.R., Rak, S., Emminger, W., Riis, B., Grønager, P.M., Durham, R.S., (2008). Sublingual grass allergen tablet immunotherapy provides sustained clinical benefit with progressive immunologic changes over 2 years. *Journal Allergy Clinical Immunology*. **121**:512–8.

Dahl, R., Kapp, A., Colombo, G., de Monchy, J.G.R., Rak, S., Emminger, W., Rivas, M.F., Ribel, M., Durham, S.R. (2006). Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Journal Allergy Clinical Immunology*. **118**:434–40

D'amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Van Cauwenberge, P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, **62**(9), 976-990.

D'Amato G, Holgate ST, Pawankar R., Ledford, D.K., Cecchi, L., Al-Ahmad, M., Al-Enezi, F., Al-Muhsen, S., Ansotegui, I., Cagnani, C.E.B., Baker, D.J., Bayram, H., Bergmann, K.C., Boulet, L.P., Buters, J.T.M., D'Amato, M., Dorsano, S., Douwes, J., Finlay, S.E., Garrasi, D., Gómez, M., Haahtela, T., Halwani, R., Hassani, Y., Mahboub, B., Marks, G., Michelozzi, P., Montagni, M., Nunes, C., Won Oh, J.J., Popov, T.A., Portnoy, J., Ridolo, E., Rosário, N., Rottem, M., Sánchez-Borges, M., Sibanda, E., Sienra-Monge, J.J., Vitale, C., Annesi-Maesano I. (2015). Meteorological conditions, climate change, new emerging factors, and asthma and related allergic disorders. A statement of the World Allergy Organization. *World Allergy Organ Journal* ;**8**(1):25.

D'Amato, G., Vitale, C., Lanza, M., Molino, A., D'Amato, M. (2016). Climate change, air pollution, and allergic respiratory diseases: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* Oct;**16(5)**:434- 40.

D'Amato. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy.* **62**.976–990

Davis, P.H. (1967). Flora of Turkey and The East Aegean Islands. **Vol: 2**, *Edinburg University Press*.

Doğru. M., ve Bostancı I. (2011). Anafilaksi ve Anafilaksideki Gelişmeler. *Journal of the Child/Çocuk Dergisi*, **11(2)**.43-53.

Durham, S.R, Emminger, W., Kapp, A., Colombo, G., de Monchy, J.G.R., Rak, S., Scadding, G.K., Andersen, J.S., Riis, B., Dahl, R. (2010). Longterm clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *Journal Allergy Clinical Immunology* **125**.131–8.

Jarolim, E., Rumpold, H., Endler, A.T., Ebner, H., Breitenbach, M., Scheiner, O., Kraft, D. (1989) IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Berula verrucosa*. *Allergy* .**44**.385-95.

Frankland, A.W., Augustin, R. (1954). Prophylaxis of summer hay-fever and asthma: a controlled trial comparing crude grass-pollen extracts with the isolated main protein component. *Lancet.* **266**.1055–7.

Kremp, G. (1965). *From Morphologic Encyclopedia of Palynology*. The Arizona Board of Regents. Reprinted by permission of the University of Arizona Press.

Fuertes-Rodriguez, C.R., Gonzalez- Parrado, Z., Vega- Maray, A.M., Valencia-Barrera, R.M. and Fernandez- Gonzalez, D. (2007). Effect of air temperature on forecasting the start of Cupressaceae pollen type in Ponferrada (Leon,Spain), *Annals of agricultural and environmental medicine*, **14**.237-42

Forsythe, P., McGarvey, L.P.A., Heaney, L.G, MacMahon, J., Ennis, M. (2000) Sensory. Neuropeptides induce histamine release from bronchoalveolar lavage cells in both nonasthmatic coughers and cough variant asthmatics. *Clinical and experimental allergy.* **30**.225-32.

Gamble, J.L., Reid, C.E., Post, E., Sacks, J. (2008). Review of the impacts of climate variability and change on aeroallergens and their associated effects. Washington, D.C. U.S. *Environmental Protection Agency*.

Gemicioğlu, B., Aydılek, R. (1998). Alerjik hastalıklar ve bronşial astım. cilt **1**, *Aktüel Tıp dergisi*; 1-22.

Gell, P.G.H., Combs, R.R.A. (1968). Clinical aspects of immunology, 2nd ed. Oxford: *Blackwell*, 575-596

D'Amato, G., Chong-Neto, H.J., Monge-Ortega, O.P., Vitale, C., Ansotegui, I., Rosario, N., Haahtela, T., Galan, C., Pawankar, C., Murrieta-Aguttes, M., Cecchi, L., Bergmann, C., Ridolo, E., Ramon, G., Gonzalez Diaz, S., D'Amato, M., Annesi-Maesano, I. (2020). The effects of climate change on respiratory allergy and asthma induced by pollen and mold allergens. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*. **75**.2219–2228.

Levy, M.L., Fletcher, M., Price, D.B., Hausen, T., Halbert, R.J., Yawn, B.P. (2006). International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care. *Prim Care Respir J*. **15**(1),20-34.

Grote, M., Vrtala, S., Niederberger, V., Wiermann, R., Valenta, R., & Reichelt, R. (2001). Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: a mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **108**(1), 109-115.

Halbritter, H., Weber, Z., Ulrich, F. R. (2009). *Pollen terminology: An illustrated Handbook.*, 8-24. *Springer*.

Heinrich, J., Wichmann, H.E. (2004). Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease. *Current Opin in Allergy Clinical Immunology*.**4**.341–8.

Heukeshoven, J., Dernick, R. (1985). *Simplified method for silver staining of proteins in polyacrilamide gels and the mechanism of silver staining*, *Electrophoresis*, 103-102.

Halbritter, H., Grímsson, S.U.F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, M.S.A. (2018). *Illustrated Pollen Terminology*. *Springer*. 38-42

Hirano, T., Takagi, K., Hoshino, Y., Abe, T. (2013). DNA damage response in male gametes of *Cyrtanthus mackenii* during pollen tube growth. *AoB Plants*. 5:plt004.

https://www.paldat.org/pub/Tilia_cordata/109974 (30/11/2020)

Ian R. Mackay, M.D., Fred S., Rosen, M.D. (2001). Allergy and Allergic Diseases; *New England Journal of Medicine* 344, no. 1

Iron, N., Nepi, M., Pacini, E. (2012). Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Ann Bot.* **109**.1201–14.

Jae-Won Oh (2018). *Pollen Allergy in a Changing World*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 1-3/165-172.

Jenkins, N., Parekh, R. B., and James, D. C. (1996). Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nature biotechnology*, **14**, 975–981

Kalyoncu, A.F. (2001). *Ülkemizde Bronş Astması Epidemiyolojisi*. Kalyoncu AF. ed. Bronş Astması. Atlas Kitapçılık Tic.Ltd.Şti., Birinci Baskı Ankara s: 1-15.

Kinet, J.P. (1999). The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annual Review Immunolgy* **17**.931-72.

Kremp, G. (1965). *From Morphologic Encyclopedia of Palynology*. The Arizona Board of Regents. Reprinted by permission of the University of Arizona Press.

Küçükusta, A.R. (2005). *Epidemiyoloji*. Gemicioğlu, B.ed. *Tanımdan Tedaviye Astım*. Turgut Yayıncılık ve Ticaret A.Ş. İstanbul s: 5–26.

Leonardi, A., Secchi, A.G., Briggs. (1992). Allansmith MR. Conjunctival mast cells and the allergic late phase reaction. *Ophthalmic Resarch* **24**.234–242

Lewis, W.H., Vinay, P., Zenger, V.E. (1983). *Airborne and allergenic pollen of North America*, **210**. Baltimore John Hopkins University Press; p. 90–6.

Loureiro, G., Rabaca, M., Blanco, B., Andrade, S, Chieira, C., Pereira, C. (2005) Aeroallergens sensitization in an allergic paediatric population of Cova da Beira, Portugal. *Allergol Immunopathol.* **33**(4).192–8

Lowell, F.C, Franklin, W. A. (1965). double-blind study of the effectiveness and specificity of injection therapy in ragweed hay fever. *New England Journal Medicine*. **273**.675–9

MacDonald, S.M., Rafnar, T., Langdon, J. (1995) Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* **269**.688-9

Mackay, M.D., red s. rosen , m.d., N Engl Journal Medicine. (2001). **344**, No. 1 · January 4,

Marsh. D.G., FREIDHOFF, L.R. (1992). *ALBE*, an allergen database. IUIS. Baltimore, MD. Edition 1,0.

Marshall, R. D. (1972). Glycoproteins. *Annual. Review. Biochemistry*. **41**.673–702.

Moneret-Vautrin, D.A., Morisset, M., Flabbee, J., Beaudouin, E., Kanny, G. (2005) Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy*, **60(4)**.443-451

Mothes, N., Valenta, R., Spitzauer, S. (2006). Allergy testing: the role of recombinant allergens. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44 (2), 125-132

Mur, P., Feo Brito, F., Lombardero, M., Barber, D., Galindo, P. A., Gomez, E., & Borja, J. (2001). Allergy to linden pollen (*Tilia cordata*). *Allergy*, **56(5)**, 457-458.

Nelson, H.S., Nolte, H., Creticos, P., Maloney, J., Wu, J., Bernstein, I.D. (2011) Efficacy and safety of timothy grass allergy immunotherapy tablet treatment in North American adults. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **127**.72–80.

Nicholson, L. B., Waldner, H., Carrizosa, A. M., Sette, A., Collins, M., and Kuchroo, V. K. (1998). Heteroclitic proliferative responses and changes in cytokine profile induced by altered peptides: implications for autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U S A*. **95**, 264 –269.

Novak, N., Allam, J.P. (2011). Mucosal dendritic cells in allergy and immunotherapy. *Allergy*. **66**.22–4.

Novak, N., Bieber, T., Allam, J.P. (2011). Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. **66**.733–9.

Özbal, Y. Temel immünoloji.(2000). I. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

Pehlivan, S. (1984). ‘’ Aeropalinolojik çalışmaların tıptaki önemi’’, *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 41(3): 315-323.

Pehlivan, S. (1995). ‘’ Türkiye’nin Alerjen Polenleri Atlası’’ 1. Baskı 1 S’’, Ünal Ofset, Ankara.

Petersen, A., Schramm, G., Schlaak, M., Becker, W. M. (1998). Post- translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen. *Clinical and experimental allergy* **28**, 315–321.

Pigott, C.D. (1991). *Tilia Cordata* Miller. *Journal of Ecology*, **79**, No. pp. 1147-1207 (british ecological society)

Pincus, M. R., Abraham, N. Z., Carty, R. P., McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2011). *Clinical enzymology*. Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Saunders, Philadelphia, 273-295.

Puc, M. (2003). Characterisation of pollen allergens. *Annals of Agricultural and Enviromental Medicine*, **10(2)**, 143-149.

Platts-Mills, T.A., Erwin, E., Heymann, P., Woodfolk, J. (2005). Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma. *Allergy*. **60(S79)**:25–31.

Pleasants, J. M., Hellmich, R. L., Dively, G. P., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Mattila, H. R., Foster, J. E., Clark, P. L., & Jones, G. D. (2001). Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98 (21)**, 11919-11924.

Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H. (2008). Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. s. *Journal Allergy Clinical Immunolgy*. **121**.847–52. e7

Radulovic, S., Wilson, D., Calderon, M., Durham, S. (2011) Systematic reviews of sublingual immunotherapy (SLIT). *Allergy*. **66**.740–52.

Radauer, C., Breiteneder, H. (2006). Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **117**(1), 141-147.

Reid, E.C., Gamble, J.L. (2009). Aeroallergens, Allergic Disease and Climate Change: *Impacts and Adaptation, Ecohealth*, **6**(3), 458-470

Ring, J., Pryzbilla, B., Ruzicka, T. (2006). *Atopy : Condition, Disease, or Syndrome*, Springer, Germany, ISBN 3-540-23133-1.

Romagnani, S. (2004). The increasing prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both *Immunology*. **112**.252–6.

Codina, R., PhD ; Richard, F., Lockey, M.D. (2016) *Pollen used to produce allergen extracts*; 1-6.

Rook, G.A., Stanford, J.L. (1998). Give us this day our daily germs. *Immunol Today* **19**.113-6.

Russell, D. J., Huby, L., Rebecca, J., Dearman, Kimber, I. (2000). Why Are Some Proteins Allergens, *AstraZeneca Central Toxicology Laboratory, Toxicological Sciences* 55, 235–246.

Scheiblhofer, S., Thalhamer, J., Weiss, R. (2018). DNA and mRNA vaccination against allergies. *Pediatr Allergy Immunol*. 29(7). 679–688.

Sastre, J. (2010) Molecular diagnosis in allergy, *Clinical & Experimental Allergy*, **40**(10), 1442-1460.

Spieksma, F.T.M. (1991) Regional European pollen calendars. In D' Amato G, Spieksma, F.T.M Bonini S editors, Allergenic pollen and pollinosis in Europe. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 49-65.

- Sharma, D., Dutta, B.K., Singh, A.B. (2010). Seasonal variation in atmospheric pollen concentration in humid tropical climate of South Assam, India. *Indian Journal Aerobiology* **23**.28–37.
- Shripad, N., Agashe. (2009). Pollen and Spores Applications with Special Emphasis on Aerobiology and Allergy, *Published by Science Publishers, Enfield, NH, USA*, 165-228
- Singh, A.B., Mathur, C. (2018) Climate Change and Pollen Allergy in India and South Asia; *Immunolgy Allergy Clinics N Am* 41. 33–52 .
- Sin, A.B., Pınar, N.M., Mısırlıgil, Z., Çeter, T., Yıldız, A., Alan, Ş. (2007). *Polen Allerjisi (Türkiye Allerjik Bitkilerine Genel Bir Bakış)*. Ankara: Engin Yayınevi.
- Singh, N., Bhatia, S., Abraham, R., Basu, S. K., George, A., Bal, V., Rath,S. (1998). Modulation of T cell cytokine profiles and peptide-MHC complex availability in vivo by delivery to scavenger receptors via antigen maleyla- tion. *Journal Immunology*. **160**. 4869 – 4880.
- Song, J., Zhang, H., Liu, Z., Ran, P. (2008). Mango profilin: cloning, expression and crossreactivity with birch pollen profilin Bet v 2, *Molecular Biology Reports*, **35** (2), 231-237.
- Soyer, Ö.U., Tuncer, A. (2007). Anafilaksi. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrical Sciences*, **3(9)**.66-74.
- Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, SH, Tognetto, M., Amadesi,S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg,M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell,S.E., Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A., Bunnett, N.W. (2000). Agonists of proteinaseactivated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nature Medicine* 6:151-8.
- Stingl, G., Maurer, D. (1997). IgE-mediated allergen presentation via FcεRI on antigen-presenting cells. *International Archives of Allergy and Immunology*113:24-9.
- Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., Behrendt, H. (2009). Determinants of allergenicity. *Journal Allergy Clinical Immunolgy*. **123**.558–66.

Tretter, V., Altmann, F., Kubelka, V., März, L., Becker, W. M. (1993). Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *International Archives of Allergy and Immunology*. **102**.259–266.

Valenta, R., Duchene, M., Vrtala, S., Brikner, T., Ebner, C., Hirschwehr, R., Breitenbach, M., Rumpold, H., Scheiner, O., Kraft, D. (1991.) Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *Journal allergy clinical immunology*. 889-894

Valenta, R., Niederberger, V. (2007). Recombinant allergens for immunotherapy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **119**(4), 8268-30.

Van Campo M, Lugardon B. (1973). Structure grenue infratectal de l'ectexine des pollens de quelques Gymnospermes et Angiospermes. *Pollen Spores* **15**.171–189

Vanselow, N.A. (1967). Skin testing and other diagnostic procedures. In: Sheldon JM, Lovell RG, Mathews KP, editors. *A manual of clinical allergy*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company

von Mutius, E., Weiland, S.K., Fritzsche, C., Duhme, H., Keil, U. (1998) Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet*. **351**.862-6.

Yazicioglu, M., Oner, N., Celtik, C., Okutan, O., Pala, O. (2004). Sensitization to common allergens, especially pollens, among children with respiratory allergy in the Trakya region of Turkey. *Asian Pac Journal Allergy Immunolgy*. **22**(4).183–90

Yıldız, B., Aktoklu, E. (2010). *Bitki Sistematiği*. sf:110/232-233. Ankara. Palme yayınları.

Walker, J.M. (2002). *The Protein Protocols Handbook*, Second edition, Humanapress.

Wodehouse, R.P. (1935). *Pollen Grains*. New York: McGraw-Hill.

Weber, R. W. (2014). Allergen of the Month—Little-leaf linden. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **113**(2), A15.

Weber, A., Schroder, H., Thalberg, K., Marz, L. (1987). Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. *Allergy* **42**. 464 – 470.

Wide L, Bennich H, Johansson SGO. (1967). Diagnosis by an in vitro test for allergen specific IgE antibodies. *Lancet*. **2**.1105–9

Wikipedia Contributors. ‘Beech’, wikipedia, *the free encyclopaedia*. 31 Augustos 2021.

Zarinhadideh, F., Amini, A., Assarehzadegan, M.A., Borsi, S.H., Sepahi, N., Sadeghi, H.A. (2015) Immunochemical and molecular characterization of allergenic profilin (Koc s 2) from *Kochia scoparia* pollen, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **58** (3), 443

CV

Delal Tivsiz

Gaziantep Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans 2021

Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi 2012

Enver Kurttepli Lisesi (YDA) 2007

YAYINLAR

Tivsiz, Delal., (2020). *Tilia Cordata* 'nın Alerjen Proteinlerinin Tanımlanması.
International Conference in Research Engineering Technology and Science 2020.